

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Regulación de la función mecánica
de aurículas aisladas de rata
por fibras sensibles a capsaicina

*TESIS
nº 966*

TESIS DOCTORAL

ALICIA NOEMÍ GÓMEZ ALVIS

- 2003 -

DONACION.....	
A.....	
Fecha 25-04-03.....	
Inv. B..... Inv. E. 57003	



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS
Nº 966

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Área Anatomía, Fisiología e Histología, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de la Dra. Ángela Grassi de Gende y la codirección de la Dra. Verónica Milesi.

Donación.....
A.....
Fecha 25-09-03.....
Inv. S..... Inv. S..... 57003

Agradecimientos

- A la Dra. Ángela O. Grassi de Gende, por haberme permitido trabajar junto a ella, por formarme en el campo de la investigación y la docencia, por dedicarme mucho de su tiempo y por haberme apoyado e incentivado en todo momento, no sólo en el plano laboral sino en el personal.
- A Verónica, por su disposición para explicarme sus conocimientos y colaborar en el análisis de los resultados.
- A todos mis compañeros de trabajo (Alejandro, Jesica, Silvia y Francisco), que de diferente manera me han brindado su ayuda para realizar este trabajo y con quienes compartimos muy buenos momentos.
- Al Dr. Gustavo Rinaldi, por cederme el espacio físico y la computadora para redactar esta tesis y haber tenido una amplia colaboración en la misma.
- A la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme dado la posibilidad de realizar esta tesis doctoral.
- A Laboratorios Bagó, por haber suministrado las ratas Sprague Dawley utilizadas en este trabajo.
- A Roly, por haberme comprendido siempre.

A mi mamá.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1- Historia	1-3
2- Botánica	3-4
3- Estructura química de la capsaicina	4-6
4- Efectos biológicos de la capsaicina	
4-1 En el sistema nervioso	7-10
4-1-1 Mecanismo de acción en el sistema nervioso	10-14
4-1-2 Usos terapéuticos y potenciales aplicaciones	14-15
4-2 En el aparato cardiovascular	15-16
4-2-1 Efectos cardíacos	16-18
4-2-2 Efectos vasculares	18-20
4-2-3 Mecanismo de acción en el sistema cardiovascular	20-22
4-2-4 Modulación de las fibras sensitivas	23-25
OBJETIVOS	26-28
MATERIALES Y MÉTODOS	29-33

RESULTADOS

1- EXPERIMENTOS MECÁNICOS

1-1 Curva dosis- respuesta a capsaicina	
- Respuestas inotrópicas	
- Respuestas cronotrópicas	
- Elección de la dosis de capsaicina con efectos excitatorios	34-38
1-2 Respuestas a las dosis de 0,5 µM de capsaicina	
1-2-1 Efectos cronotrópicos, inotrópicos y lusitrópicos de la	

capsaicina 0,5 μ M a frecuencia de contracción espontánea.	
Participación de los neurotransmisores liberados de las	
Fibras sensibles a capsaicina.	39-42
1-2-2 Respuestas a capsaicina 0,5 μ M en la aurícula latiendo a	
frecuencia de contracción constante. Efecto del bloqueo	
de los receptores de CGRP.	43-45
1-2-3 Efectos excitatorios de capsaicina en condiciones de variación	
del calcio extracelular	
1-2-3-1 Cambios en la concentración de calcio externo y	
bloqueo de canales de calcio sensibles al voltaje	46-49
1-2-3-2 Bloqueo de canales de potasio de la membrana	
celular	49-50
1-3 Participación de las fibras sensibles a capsaicina en los cambios	
mecánicos producidos por la acidosis metabólica	
1-3-1 Experimentos a frecuencia de contracción espontánea	
- Efectos contráctiles inducidos por el pH ácido en presencia de rojo	
de rutenio 5 μ M y en presencia de rojo de rutenio 5 μ M y	
capsaicina 0,5 μ M.	51-58
1-3-2 Experimentos a frecuencia de contracción constante	
- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido en aurículas	
pretratadas con capsaicina 0,5 μ M y en aurículas	
pretratadas con rojo de rutenio 5 μ M	
- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido y por el pH	
ácido en presencia de CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	
- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido en aurículas	

pretratadas con capsaicina 0,5 μ M seguido de dos lavados
consecutivos

- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido en aurículas

pretratadas con isoproterenol 0,01 μ M 58-65

2- EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS

2-1 Efectos de la capsaicina sobre corrientes de sodio sensibles a
tetrodotoxina

- Efectos de la capsaicina sobre la inactivación de la I_{Na} 66-71

2-2 Respuesta mecánicas a la capsaicina y tetrodotoxina 71-74

DISCUSIÓN 75-86

CONCLUSIONES 87-89

BIBLIOGRAFÍA 90-105

INTRODUCCIÓN

REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN MECÁNICA DE AURÍCULAS AISLADAS DE RATA POR FIBRAS SENSIBLES A CAPSAICINA

INTRODUCCIÓN

1- Historia

Durante miles de años, las especias han sido utilizadas para condimentar carnes, vegetales y cereales. Dentro de estas especias, los frutos de las plantas del género *Capsicum* (indistintamente llamados ají, chillie o pimienta), tienen el uso más antiguo y globalizado en las cocinas del mundo debido a sus importantes atributos sensitivos como color, pungencia y aroma.

Piezas arqueológicas halladas en México indican que sus habitantes comían chillies desde épocas prehistóricas (7000 AC). Fue una de las primeras plantas cultivadas para uso doméstico en América y en distintos lugares del Perú se recolectaban diferentes especies del género *Capsicum* (1). En la alfarería de la cultura Nazca, al sur del Perú, se han encontrado dibujos del fruto del capsicum. El pimienta constituía un elemento básico en la alimentación de los aborígenes americanos y sus usos culinarios eran diferentes en función de las variedades, algunas de las cuales eran de uso exclusivo de las clases altas (2). El capsicum está asociado históricamente con el descubrimiento del Nuevo Mundo. En la correspondencia enviada por Colón a los Reyes Católicos de España durante su primer viaje a América, ya se mencionaba la costumbre de sus habitantes de ingerir comidas condimentadas con especias muy picantes. Diego Alvarez

Chanca, el médico sevillano que acompañó a Colón en su segundo viaje, fue quien realizó el primer informe detallado de la especia picante llamada "Aji", y observó además de sus usos culinarios, los medicinales, que abarcaban el tratamiento de una serie de males, desde las picaduras y el dolor, hasta la constipación. Más tarde, viajeros a distintos países de Hispano América confirmaron aplicaciones similares. Además del empleo culinario y medicinal, los indios habitantes del Caribe utilizaron el humo irritante, proveniente de la quema de los frutos del ají, como arma contra los invasores españoles, un uso actualizado, ya que hoy se incluye como componente irritante en los aerosoles de defensa personal. El *Capsicum* fue introducido en España por el mismo Chanca, desde allí fue extendiéndose rápidamente por el resto de Europa y hacia 1498, a través de viajeros portugueses llegó a la India (3). Hasta ese momento, en el Viejo Mundo la única especia con sabor picante utilizada para condimentar las comidas era la "pimienta negra" (*Piper nigrum* de la familia Piperaceae). Durante centenares de años, mercaderes venecianos y árabes ejercieron el monopolio del comercio de la pimienta, lo cual generó un precio exorbitante de la misma y que solo pudiera ser consumida por gente adinerada. Así, el capsicum fue muy bien recibido en Europa para sustituir a la pimienta negra y debido a las similitudes de sabor entre ambas, se le dio al *Capsicum* el nombre de "pimiento".

Recientemente se ha descubierto que el pimiento posee una importante actividad antibacteriana (4) lo cual podría explicar que, en países de clima tropical donde es muy factible la contaminación de la comida, sean muy comunes los platos que incluyen chillies.

Hoy en día, aproximadamente un cuarto de la población mundial utiliza *Capsicum* diariamente y el consumo ocurre tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Además, en el comercio de las especias ocupa el segundo

lugar, detrás de la pimienta, considerando tanto el volumen como los valores comercializados (3).

2- Botánica

El pimiento es una planta cuyo origen botánico cabe centrarlo en América del Sur, concretamente en el área de Perú-Bolivia, desde donde se expandió al resto de América Central y Meridional. El género *Capsicum* perteneciente a la familia de las *Solanáceas* fue descrito por Tournefort en 1719 y adoptado por Linneo en 1753 e incluye diferentes especies. Si bien el género es homogéneo, no existe concordancia en lo que concierne a las especies debido a una variabilidad genética apreciable, lo cual hace que sea una planta con una complicada botánica taxonómica (2). Existen referencias de la presencia del género en la zona del noroeste de nuestro país describiéndose incluso especies autóctonas (*Capsicum chacoense* A.T. Hunziker).

El término *Capsicum* podría provenir del latín “capsicus” que significa “de forma capsular”, haciendo referencia a la forma del fruto o del griego “kapso” que significa “picar”. Existen muchas confusiones con el término “pimiento”; así “chilli” era el nombre utilizado en México cuando llegaron los españoles y es el que permanece hoy en día, no sólo en México sino en toda América del Norte; en Sud América e India se lo sigue denominando con su nombre más antiguo “ají”; “pimiento rojo” es como se lo conoce en la mayoría de los países de habla inglesa; el término “paprika” es utilizado en Hungría derivado de *peperke* que significa pimiento en eslavo y “pepperoni” es el nombre actual de la mayoría de las variedades picantes que se comen en Italia. Todas estas denominaciones se refieren a especies del género *Capsicum*, algunas de las cuales se caracterizan

por su sabor picante, otras por su sabor más dulce, otras por su aroma y otras por su color. Existen de 1600 a 1700 especies de *Capsicum* en el mundo, pero solo alrededor de 200 están disponibles para el comercio (3).

Los pimientos poseen un alto contenido de vitamina A y aún más de vitamina C. En 1937 Albert Szent-Gyorgyi, un investigador húngaro obtuvo el Premio Nobel en Medicina y Fisiología por la deducción de la fórmula de la vitamina C aislada del pimiento (5).

El principio responsable del carácter pungente e irritante se denomina capsaicina, se halla presente en distintas proporciones en las especies de *Capsicum* y se encuentra en las capas externas de las placentas, o sea en los tejidos que sostienen a las semillas.

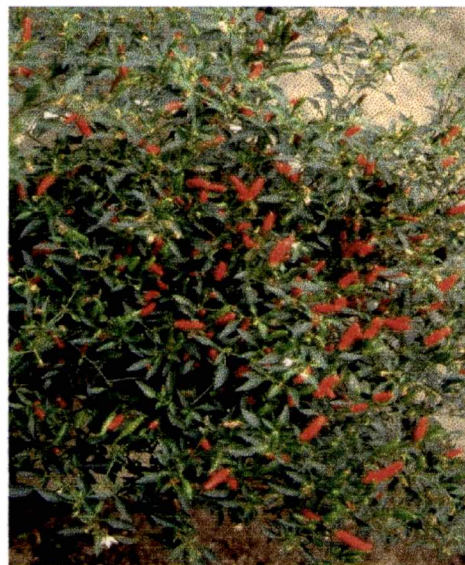


Figura 1: Especie *Capsicum frutescens*, del género *Capsicum*, con alto contenido de capsaicina.

3- Estructura química de la capsaicina

A pesar de que las propiedades biológicas del *Capsicum* eran conocidas y utilizadas durante cientos de años, recién en la primera parte del siglo XIX

comenzaron los estudios sobre la estructura química de sus principios activos. Bucholz fue el primero que demostró que los componentes pungentes eran extraíbles con solventes orgánicos, Thresh los aisló por cristalización y propuso el nombre de **capsaicina** para los mismos (6) y Nelson, identificó los productos de hidrólisis y dilucidó la estructura molecular como la *trans*-8-metil-N-vainillil-6-noneamida (7-9).

La estructura básica de la capsaicina es un amida, con un anillo hidrofílico en un extremo y una cadena hidrocarbonada lipofílica en el otro extremo (región B, región A y región C, respectivamente, de la Fig 2, I).

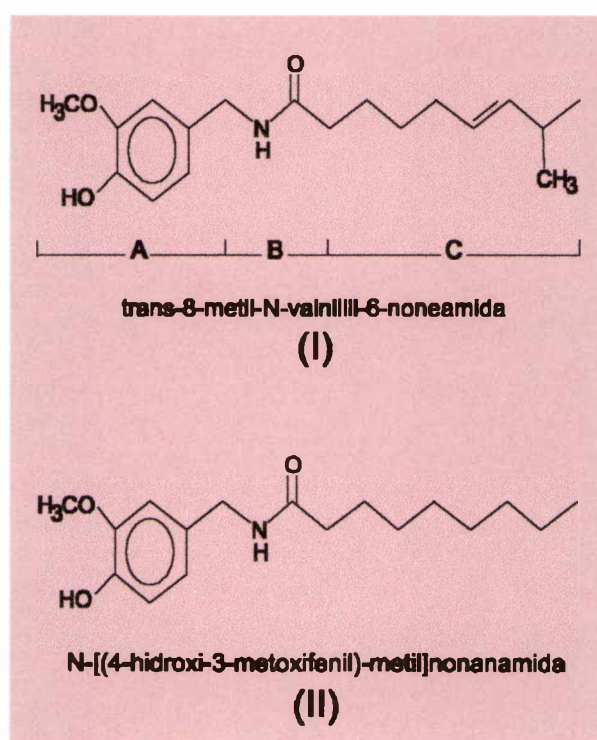


Figura 2: Estructura química de la capsaicina (I) y del análogo denominado “capsaicina sintética” (II).

Un análogo de la molécula de la capsaicina natural obtenida por síntesis química es la N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)-metil]nonanamida), que difiere en la ausencia del doble enlace y del grupo metilo de la cadena hidrocarbonada (Fig 2,

II). Este compuesto es habitualmente denominado “capsaicina sintética” y se ha demostrado que en células cultivadas de los ganglios espinales aumenta el influjo de calcio en forma similar a la capsaicina natural, siendo éste un ensayo “in vitro” que posee validez para estimar la actividad analgésica de estos compuestos (10).

La oleoresina de los frutos del *Capsicum*, obtenida por percolación con solventes volátiles adecuados, es un líquido denso de color rojo oscuro y sumamente irritante que contiene todos los principios activos; tan solo en la fracción volátil de la resina existen por lo menos 100 compuestos químicos diferentes. De la oleoresina han sido aislados un grupo de compuestos con estructuras químicas semejantes en cantidades del orden de 0.003 a 1.5% denominados “capsaicinoides” o “compuestos vainílicos”; de éstos, la sustancia predominante es la capsaicina y el resto corresponde a una serie de estructuras homólogas presentes en concentraciones mucho menores (1).

La cromatografía gaseosa asociada a la espectrometría de masa ha revelado la presencia de cuatro capsaicinoides importantes además de la capsaicina: dihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina (11) (Fig 3).

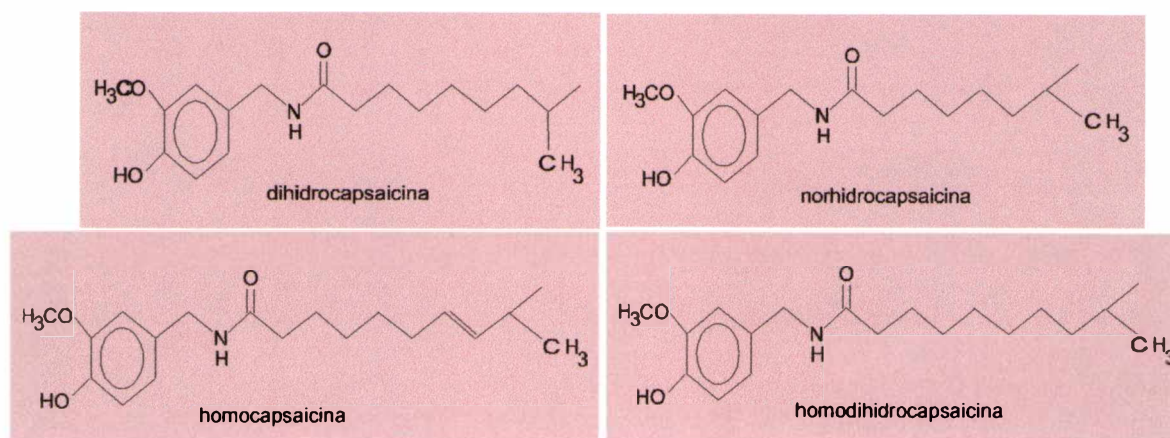


Figura 3: Estructura química de los capsaicinoides.

4- Efectos biológicos de la capsaicina

4-1 En el sistema nervioso

Como se citó en la reseña histórica desde la época precolombina se conocía que los frutos que contienen la capsaicina producían irritación de la piel y mucosas; sin embargo, recién hacia fines de 1940 Nicholas Jancsó, un farmacólogo húngaro, aparentemente preocupado por el uso de la paprika en las comidas para los niños, comenzó una amplia caracterización de los efectos farmacológicos de la capsaicina y sus análogos sobre algunos procesos sensitivos en los mamíferos. Sus estudios demostraron que la mayoría de los efectos biológicos de la capsaicina se debían a una intensa excitación inicial de neuronas sensitivas seguido por un prolongado período de insensibilidad de las mismas a estímulos fisicoquímicos, incluyendo los estímulos naturales de las terminales nerviosas sensitivas.

La capsaicina actúa específicamente en fibras nerviosas sensitivas aferentes de pequeño diámetro, tipo C no mielinizadas y A δ mielinizadas, produciendo la liberación de diferentes neurotransmisores como sustancia P (SP), péptido del gen relacionado con calcitonina (CGRP), neuroquininas y somastostatina, tanto de las terminales periféricas como de las centrales (12). Recientemente, ha sido descrito que en la rata, la capsaicina también induce la liberación de endotelina de dichas terminales nerviosas sensitivas (13). Estas fibras forman parte de la vía aferente de la sensibilidad dolorosa (nocicepción). Debido a la gran especificidad de la capsaicina sobre esta subpoblación de fibras

sensitivas es comúnmente usado el término “fibras sensibles a la capsaicina” para hacer referencia a las mismas.

La acción de la capsaicina y sus análogos produce diferentes grados de alteración de la función en las neuronas sensibles a los mismos. La respuesta inmediata producida por la excitación de la fibra sensitiva es la liberación de neurotransmisores (neuroquininas, SP, CGRP, somastotatina) desde sus terminales nerviosas aferentes. Luego de esta respuesta aguda, la capsaicina bloquea la respuesta de estas fibras sensitivas a los estímulos naturales, efectos acompañados de cambios ultraestructurales en el nervio de tipo total o parcialmente reversibles. La acción más pronunciada es un efecto neurotóxico degenerativo con destrucción de las neuronas sensitivas primarias involucradas en la nocicepción cuando la capsaicina se administra en ratas neonatas. En este caso la destrucción celular es irreversible (14).

La selectividad de capsaicina sobre las neuronas sensitivas de la vía del dolor se sostiene en el hecho de que dosis que liberan SP de las mismas no afectan las raíces ventrales de la médula espinal ni otro tipo de neuronas del sistema nervioso central y periférico (15).

Diferentes estudios han demostrado que los efectos de la capsaicina sobre las fibras sensitivas nociceptivas dependen de la dosis, de la vía de administración y de la especie y edad del animal. Han sido estudiadas diferentes concentraciones en dosis únicas (2,5 a 125 mg/Kg) y en dosis acumulativas (266 a 950 mg/Kg) de capsaicina que fueron administradas por distintas vías sistémicas (subcutánea, intraperitoneal e intravenosa); los resultados obtenidos verifican la liberación de SP, aunque en diversas proporciones y en diferentes zonas del sistema nervioso, así como la selectividad de la capsaicina sobre las fibras sensitivas de tipo C. La administración intratecal de capsaicina (30 µg) en

ratas adultas, vía que restringe su acción a la médula espinal, produjo una depleción del 55% de la sustancia P localizada en las terminales primarias aferentes sensitivas y el desarrollo de una prolongada analgesia térmica producto de dicha depleción (16). La depleción de SP y la depresión de la nocicepción es más duradera en cobayos que en ratas adultas. Coincidentemente, la disminución de la sensibilidad al calor inducida por capsaicina es más marcada en cobayos que en ratas y ratones, ya sea tratados como neonatos o como adultos. Esta diferencia entre especies podría deberse a una distinta densidad de la innervación aferente primaria (15).

El tratamiento con capsaicina (50 mg/Kg subcutánea) en ratas recién nacidas (2 días) produce una pérdida completa e irreversible de la función de las neuronas primarias sensitivas sensibles a la droga, mientras que en ratas adultas, el mismo tratamiento, produce la pérdida transitoria de la funcionalidad que no se acompaña de degeneración neuronal (17). El efecto en las ratas neonatas podría deberse a que las acciones de ciertos factores de crecimiento neuronales serían afectadas secundariamente por el tratamiento con la capsaicina (15).

La aplicación local de capsaicina sobre los nervios ciático y safeno de rata disminuye la percepción del dolor en el territorio innervado por los mismos por un tiempo prolongado (18). También aplicada sobre el nervio ciático de rata, cobayo, conejo y gato inhibe el transporte axoplásmico de SP y somatostatina (19). El efecto local sobre las fibras C sensitivas que responden al calor es el bloqueo de la transmisión nerviosa ya que cuando se aplica calor radiante sobre la piel o se estimula eléctricamente la fibra, la frecuencia de los potenciales de acción disminuye en un 75 % (20). La capsaicina aplicada a células de cultivo del ganglio trigémino evoca una combinación de potenciales de acción lentos y/o rápidos; células menos sensibles respondieron con despolarizaciones lentas y pequeñas

incluso a las concentraciones más altas de capsaicina. El mismo patrón de respuestas se obtuvo en cultivos de células del ganglio de la raíz dorsal de rata (21).

Dentro de las diversas acciones farmacológicas de la capsaicina sobre el sistema nervioso central se hallan sus efectos sobre la termorregulación en mamíferos. Los primeros estudios realizados, demostraron que la administración sistémica de capsaicina produce efectos hipotérmicos semejantes a los producidos por histamina. Las respuestas hipotérmicas producidas por el tratamiento agudo de capsaicina fueron atribuidas a la estimulación de los receptores hipotalámicos termosensibles, seguido por una desensibilización de dichos receptores después del tratamiento crónico o en dosis altas. Los ensayos de microinyecciones intracerebrales de capsaicina en el hipotálamo de ratas produjeron los mismos resultados (22).

4-1-1 Mecanismo de acción en el sistema nervioso

La selectividad de los efectos biológicos de la capsaicina sugirió la existencia de sitios específicos donde la droga ejerce su acción farmacológica. En 1968 Jancsó, postuló la existencia de "receptores de dolor" sensibles a la capsaicina. Esta expresión sólo indicaba la posibilidad de un sitio específico de acción sin identificar la naturaleza del mismo. Durante las dos décadas pasadas, los hipotéticos receptores de la capsaicina han sido muy estudiados. Los métodos con capsaicina radiomarcada y de fotoafinidad no lograron la identificación del receptor. Sólo con el uso de la resiniferatoxina, un análogo natural cientos de veces más potente que la capsaicina, aislado de *Euphorbia resinífera*, se logró identificar el receptor de capsaicina (23). La estructura química de esta toxina

consiste en un anillo sustituido idéntico al de capsaicina que contiene un diterpeno apolar mas rígido en reemplazo de la cadena alquílica.

Estudios recientes han demostrado que la capsaicina y sus análogos (compuestos vainílicos) poseen un receptor específico denominado VR1 (receptor vainílico subtipo 1) en las neuronas sensitivas. Es un receptor canal-catiónico que cuando es activado aumenta la conductancia de diferentes cationes monovalentes y divalentes. Aparentemente, VR₁ no discrimina entre los cationes monovalentes pero exhibe una notable preferencia por los cationes divalentes (secuencia de permeabilidades: $\text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++} > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$) (24). Este aumento de la permeabilidad a los cationes cuando el receptor es activado, genera la despolarización de la membrana de la terminal sensitiva y produce la liberación de los diferentes neurotransmisores sin la intervención de segundos mensajeros (Fig 4).

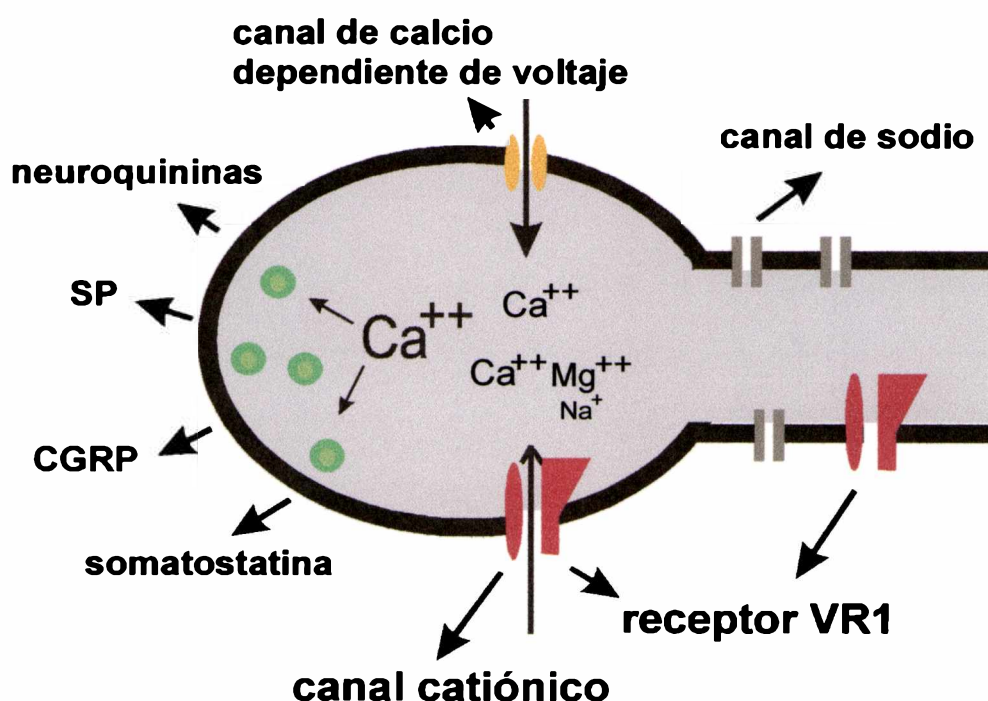


Figura 4: Mecanismo de acción de la capsaicina en las terminales nerviosas sensitivas.

La capsaicina activa a su receptor de una manera dosis-dependiente y la resiniferatoxina activa el mismo receptor de capsaicina pero a dosis menores (25). Se ha demostrado que el VR₁ también es activado por estímulos térmicos nocivos sugiriendo que un rol fisiológico del receptor vainílico "in vivo" es detectar el calor nocivo (24). Los análisis de hidrofiliidad sugieren que el VR₁ posee seis dominios de transmembrana, con dos uniones intracelulares y cuatro extracelulares. Posee una unión hidrofóbica corta entre las regiones de transmembrana 5 y 6 que podría conferirle permeabilidad iónica. El segmento hidrofílico amino-terminal posee una región relativamente rica en prolina seguido por tres dominios de anquirinas (Fig 5).

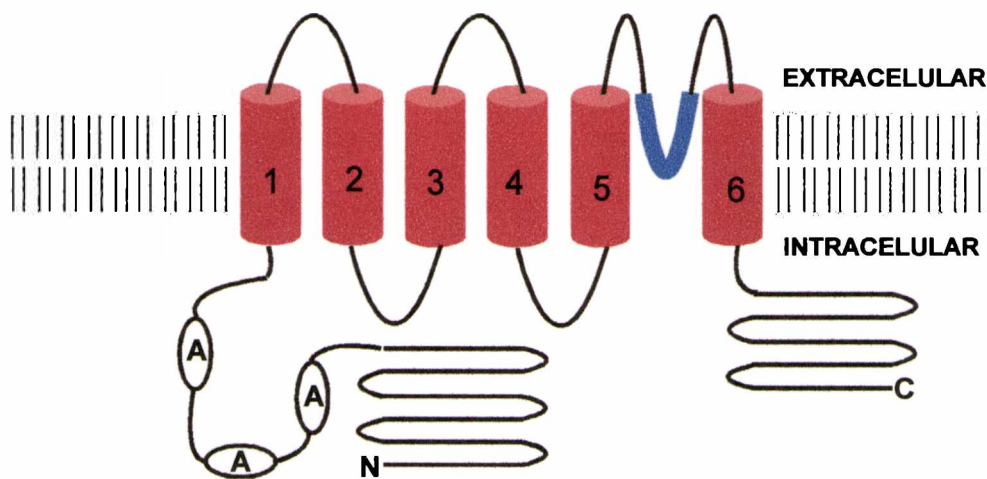


Figura 5: Esquema del modelo que representa al canal-receptor VR₁. A= anquirina.

La capsaicina produce idénticas respuestas cuando se adiciona del lado extracelular o del intracelular, sugiriendo que atraviesa la membrana debido a su alta lipofiliidad y se une al dominio citosólico del receptor VR₁ (24, 26). Sobre esta base se ha propuesto la existencia de una sustancia endógena en el citosol de las neuronas sensitivas capaz de activar al receptor. Se asume que la unión de la capsaicina al canal es directa, ya que el gen clonado del VR1 por sí solo, expresado en oocitos, posee afinidad por capsaicina y respuesta biológica a

capsaicina (26). El receptor vainílico también ha sido identificado en las terminaciones centrales de las neuronas aferentes primarias humanas (27).

El rojo de rutenio, un colorante inorgánico, bloquea el canal catiónico sensible a capsaicina (28) de forma no competitiva y la capsazepina, un análogo estructural de la capsaicina, bloquea específicamente y de manera competitiva el sitio de unión de la misma, funcionando como un antagonista competitivo específico (29).

El canal catiónico sensible a la capsaicina es activado por disminuciones de pH y fue propuesto que los protones liberados por los tejidos circundantes a la terminal nerviosa podrían actuar como ligandos endógenos que lo activan (14). En la aurícula aislada de cobayo la liberación de CGRP inducida por el pH ácido es bloqueada por la capsazepina (30) y por el rojo de rutenio (28). Sin embargo, estudios recientes en tejido nervioso, han propuesto que el protón no sería un activador endógeno del receptor de capsaicina sino un modulador alostérico de la actividad del canal (26).

Además de los efectos específicos descritos, la capsaicina posee acciones inespecíficas sobre neuronas no sensitivas y células no neuronales. Estos efectos no selectivos incluyen inhibición de la agregación plaquetaria (31), disminución de la excitabilidad del músculo cardíaco, inhibición de la actividad del músculo liso visceral y alteración de diferentes actividades enzimáticas (32); los mecanismos que median estos efectos no han sido aún dilucidados pero no se producirían por activación de un receptor específico y se ha sugerido una interacción directa de la capsaicina con la membrana citoplasmática que afecta a la estructura y a la funcionalidad de la misma. Está demostrado que la capsaicina modifica drásticamente las propiedades estructurales de los fosfolípidos naturales más abundantes en las membranas biológicas (fosfatidilcolina y

fosfatidiletanolaminas) (32) , que altera la fluidez de la membrana plasmática de células no neuronales (31) y que induce la formación de canales iónicos no selectivos, con una gran diversidad de conductancias, en bicapas lipídicas libres de proteínas (33). De lo expuesto se deduce que la acción directa de la capsaicina sobre los diferentes tipos de células es extremadamente heterogénea.

4-1-2 Usos terapéuticos y potenciales aplicaciones

Tradicionalmente, los extractos del pimiento fueron utilizados como tratamiento para diferentes tipos de dolor. Eran aplicados sobre la zona afectada produciendo una rubefacción mayor a la que produce la aplicación de calor. Actualmente, el uso de la capsaicina en el tratamiento del dolor, se basa en la aplicación repetitiva, ya que solo así se logra el bloqueo de las neuronas sensitivas. Este bloqueo se obtiene cuando desaparecen los efectos locales por la aplicación repetida de la droga (enrojecimiento, sensación de ardor local), fenómeno que es utilizado para determinar el número de administraciones a realizar. Las dosis farmacológicas deben ser suficientes para una masiva desensibilización de las fibras y la aplicación debe seguir estrictamente la distribución nerviosa del área del dolor (23).

El gran interés que despierta la capsaicina como analgésico se debe a que posee un mecanismo de acción diferente al de los analgésicos esteroides y no esteroides, siendo estos últimos no efectivos en el tratamiento de muchos síndromes de dolor crónico. Los primeros ensayos de la capsaicina en el tratamiento del dolor fueron descriptos para la neuralgia posherpética, demostrando el efecto terapéutico de la droga mediante repetidas aplicaciones locales. Estos datos fueron confirmados en el tratamiento del dolor de la

posmastectomía. Más tarde, se comprobó que pacientes con cuadros dolorosos provocados por neuropatía diabética respondían al tratamiento con capsaicina en aplicaciones sucesivas. También se ha descrito el uso de capsaicina en la osteoartritis, en distrofia refleja simpática y en el síndrome de Guillain-Barré. Estudios recientes describen la aplicación de capsaicina en la mucosa nasal en pacientes afectados por cefaleas agudas y repetidas, y en pacientes con dolor en la mucosa oral secundario a la aplicación de quimioterapia o radioterapia (23).

Los efectos adversos más comunes al uso tópico de la capsaicina son ardor, dolor agudo y eritema en el lugar de la aplicación; si bien estas reacciones deben desaparecer a medida que prosigue el tratamiento, son causa de discontinuidad del mismo. Recientes estudios de relación estructura-actividad han desarrollado un nuevo análogo de capsaicina, el SDZ 249-665, que posee los mismos efectos analgésicos que la capsaicina pero sin ningún efecto excitatorio (irritación, broncoconstricción y cambios en la presión arterial) ni taquifilaxia suministrado por diferentes vías de administración en ratones, ratas y cobayos (34). Se ha demostrado que la administración oral de civamida, el isómero *cis* de la capsaicina (obtenido únicamente por síntesis), a ratas adultas posee la misma actividad analgésica. Debido a que no se observaron cambios en la concentración de CGRP ni SP en la raíz dorsal de la médula espinal se sugiere que la acción analgésica de la civamida se debe a la desensibilización de las terminales primarias sensitivas aferentes (35). En base a estos últimos estudios, se estima que en un futuro, análogos más específicos, sin efectos adversos y con biodisponibilidad oral serán una importante alternativa terapéutica en el tratamiento del dolor.

4-2 En el aparato cardiovascular

Por muchos años, los estudios sobre el control neuronal de la función cardiovascular han estado focalizados en las acciones antagónicas de la inervación simpática y parasimpática. En las últimas dos décadas, el desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica, microscopía electrónica y electrofisiología han replanteado el conocimiento del control autonómico sobre la función cardiovascular. Como ha sido revelado por inmunohistoquímica, el sistema de fibras sensibles a la capsaicina está íntimamente asociado con el sistema cardiovascular (36). La función primordial de las neuronas primarias aferentes sensitivas es la transmisión de impulsos nociceptivos, algunos de los cuales contribuyen a la percepción del dolor de la isquemia cardíaca, de la claudicación y de los aneurismas.

Un aspecto de importancia fisiológica reside en el hecho de que una vez que han sido activadas por un estímulo periférico, estas fibras sensibles a la capsaicina liberan localmente distintos neurotransmisores que pueden producir respuestas en los tejidos inervados. En el aparato cardiovascular las terminaciones periféricas son capaces de responder a estímulos del entorno induciendo respuestas vasculares, cardíacas e inflamatorias *locales*, sin ninguna relación con la transmisión aferente de mensajes hacia el sistema nervioso central (36).

4-2-1 Efectos cardíacos

En aurículas aisladas de cobayo, la estimulación eléctrica de campo produce una respuesta cardioexcitatoria resistente al bloqueo de receptores

colinérgicos y adrenérgicos pero sensible al tratamiento con capsaicina (36). Esta evidencia farmacológica sugiere un rol fisiológico de las fibras sensitivas en el corazón. La estimulación eléctrica o la exposición a la capsaicina del tejido cardíaco produce la liberación de neurotransmisores de las fibras aferentes sensitivas con efectos estimulatorios, CGRP y ATP, e inhibitorios, SP y NKA, sobre la función cardíaca (36).

Los resultados son consistentes en que la respuesta prevalente a la capsaicina es el aumento de la frecuencia de latido espontáneo (efecto cronotrópico positivo) tanto en aurícula (37) y corazón aislado de rata (38) como en aurícula (39, 40–44) y corazón aislado de cobayo (42, 43). Sin embargo, los efectos de la capsaicina sobre la contractilidad cardíaca son muy diversos dependiendo de las especies, las preparaciones y las concentraciones utilizadas. En el corazón de cobayo, la capsaicina a concentraciones de 1.6 nM (39), 0.33 μ M (41) y en el rango de 0.01 a 1 μ M (42, 43) produce un incremento de la contracción (efecto inotrópico positivo) o una disminución de la contracción (efecto inotrópico negativo) a concentraciones de 0.1 μ M en corazón entero (44) y en músculo papilar (41) de la misma especie. En aurícula de rata, la capsaicina 1 μ M produce un aumento de la fuerza desarrollada (37) mientras que en el corazón aislado una concentración de 1nM causa un aumento transitorio de la misma seguido de una depresión (38). Concentraciones de capsaicina del orden nanomolar disminuyen marcadamente el flujo coronario con el consecuente deterioro de la función cardíaca (13). En músculo papilar de rata, la capsaicina produce un efecto inotrópico negativo dependiente de la concentración (1 nM a 10 μ M) que ha sido relacionado con un efecto directo de la capsaicina sobre el miocito cardíaco (45). Este último trabajo es el único que analiza un posible efecto

lusitrópico positivo en base a una leve disminución del tiempo medio de la relajación (8%).

Las fibras sensibles a la capsaicina están involucradas en el control de la función cardíaca durante condiciones fisiopatológicas habiéndose descripto una importancia significativa de los neurotransmisores liberados desde las terminaciones de las fibras sensitivas en la respuesta mecánica durante la reperfusión miocárdica luego de un período de isquemia (46, 47) así como en el fenómeno de preconditionamiento en la isquemia miocárdica (48, 49). Por otra parte se ha propuesto que la capsaicina posee efectos antiisquémicos y antiarrítmicos no relacionados con la liberación de neuropéptidos ya que la dosis necesaria para producirlos es mayor (30 μM) que la necesaria para la liberación de neurotransmisores (1 μM) (50).

4-2-2 Efectos vasculares

Si bien el tono de los vasos sanguíneos está regulado por la actividad simpática basal, evidencias farmacológicas muestran que en diversos lechos vasculares las fibras aferentes sensitivas responden a la capsaicina liberando neuropéptidos como la SP y el CGRP con propiedades vasoactivas. El CGRP produce vasodilatación independiente del endotelio en varios lechos vasculares (51), excepto en la aorta de rata (51, 52) y en la arteria iliaca porcina (53); la SP en cambio, produce tanto en las arterias de gran calibre como en la microvasculatura de la piel una vasodilatación dependiente del endotelio (36). Específicamente en las arterias coronarias tanto de animales como de humanos (54, 55), la SP posee un efecto dual; por una lado vasodilata en forma dependiente del endotelio mediante la activación de receptores para

neuroquininas, NK1 (56), lo cual produce la liberación de óxido nítrico (NO); por otro lado induce un efecto vasoconstrictor independiente del endotelio. En estos mismos vasos, el CGRP posee un potente efecto vasodilatador independiente del endotelio por interactuar con receptores específicos (53), demostrado en diversas especies incluida la humana (57, 58). En las arterias coronarias de rata, la capsaicina produce una marcada vasoconstricción debido a la liberación de endotelina de las terminales nerviosas sensitivas (13).

De la misma manera que lo descrito para la función cardíaca, la disminución o la pérdida de la funcionalidad de las fibras aferentes sensitivas que inervan los vasos estarían relacionadas con estados fisiopatológicos. Debido al rol del CGRP en la modulación del tono vascular, la modificación de sus efectos podría influir en el desarrollo de la hipertensión esencial y en la desarrollada en edad avanzada. Existe una disminución de la funcionalidad de las fibras sensibles a la capsaicina en los vasos mesentéricos de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en edades tempranas y una disminución de la sensibilidad vascular al CGRP con la edad, tanto en las ratas normotensas como en las hipertensas (53). Estudios de inmunohistoquímica han revelado una disminución del contenido de CGRP de las fibras sensitivas periféricas durante el desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión en ratas SHR (59) como también una respuesta aumentada al CGRP exógeno, posiblemente como consecuencia de una mayor expresión de los receptores en las células de la pared vascular debida a la menor presencia del agonista (36). Las enfermedades crónicas, como la diabetes, relacionadas con neuropatías del sistema nervioso autónomo (60) también presentan alteraciones en las fibras sensitivas aferentes. En esta enfermedad, la velocidad de conducción (61) y el contenido de los neuropéptidos de los nervios sensitivos se hallan disminuidos (62). En el lecho vascular

mesentérico de animales con diabetes inducida por estreptozotocina fue observado un severo deterioro de la función vasodilatadora de las fibras sensitivas, mientras que no fue afectada la neurotransmisión simpática (62).

4-2-3 Mecanismo de acción en el sistema cardiovascular

El CGRP es el principal neurotransmisor propuesto como mediador de los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos de la capsaicina (36, 42, 44, 63). Si bien en el corazón ha sido demostrada la co-liberación de neuroquininas (sustancia P, neuroquinina A y neuropeptido K) y de CGRP, sólo este último ha imitado las respuestas cardíacas a la estimulación eléctrica (43, 64). El CGRP, mediante la activación de los receptores CGRP₁ activa la adenilato ciclasa (65) y aumenta los niveles intracelulares de AMP_c, segundo mensajero que media los efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos producidos por la exposición a la capsaicina en aurícula de rata (37). El ATP en aurícula y ventrículo de rata, produce respuestas inotrópicas positivas mediadas por purinorreceptores de tipo P₂ (66); sin embargo su rol más importante sería como neuromodulador de las fibras cardíacas sensitivas en las cuales, por activar receptores presinápticos de tipo P₁, inhibe la liberación de neurotransmisores (67).

La depresión en la contractilidad producida por la capsaicina podría deberse a la acción de otros neurotransmisores coliberados como la NKA (43) o la SP, que actúan indirectamente liberando acetilcolina, un agente inotrópico negativo (36, 46). Alternativamente es posible postular una acción directa depresora de la droga sobre los miocitos cardíacos (45).

La vasodilatación producida por la estimulación de las fibras sensibles a capsaicina cercanas a la circulación coronaria, es imitada por el CGRP pero no

por el resto de los neuropéptidos (53) que se coliberan con este neurotransmisor, por lo cual se sostiene que el CGRP es el neurotransmisor fisiológicamente activo, que participa en la regulación de la circulación coronaria. Resultados similares se han descripto para otros lechos vasculares como las arteriolas del músculo estriado (68) y los vasos mesentéricos de rata (69, 70-72), las arterias pulmonares de cobayo (73), los vasos cerebrales (74-76) y la arteria central de la oreja de conejo (77). La explicación podría ser que, las fibras sensitivas que se encuentran por fuera de la capa media de los vasos sanguíneos están anatómicamente cerca de los receptores de CGRP ubicados sobre el músculo liso y más alejadas de los receptores de SP, que se encuentran sobre el endotelio (36). El CGRP liberado de las fibras sensibles a capsaicina, contribuye al control de la resistencia vascular (53). En arteriolas de músculo estriado, el bloqueante específico del CGRP (CGRP₈₋₃₇) produce una pequeña constricción adicional en vasos precontraídos con norepinefrina, lo cual sugiere la intervención del CGRP en la modulación de su tono (78).

El ATP posee un efecto vasodilatador independiente del endotelio, producido por su unión a purinorreceptores P₂ ubicados en el músculo liso de las arterias coronarias (79, 80) por lo cual, tanto el ATP como el CGRP serían co-transmisores vasodilatadores de las fibras sensitivas en este lecho vascular. Por otra parte el ATP produce vasodilatación dependiente del endotelio, por interactuar con receptores P₂ endoteliales que producen la liberación de factor relajante dependiente de endotelio. El mismo endotelio, puede ser una posible fuente de SP y ATP (36) (Fig. 6).

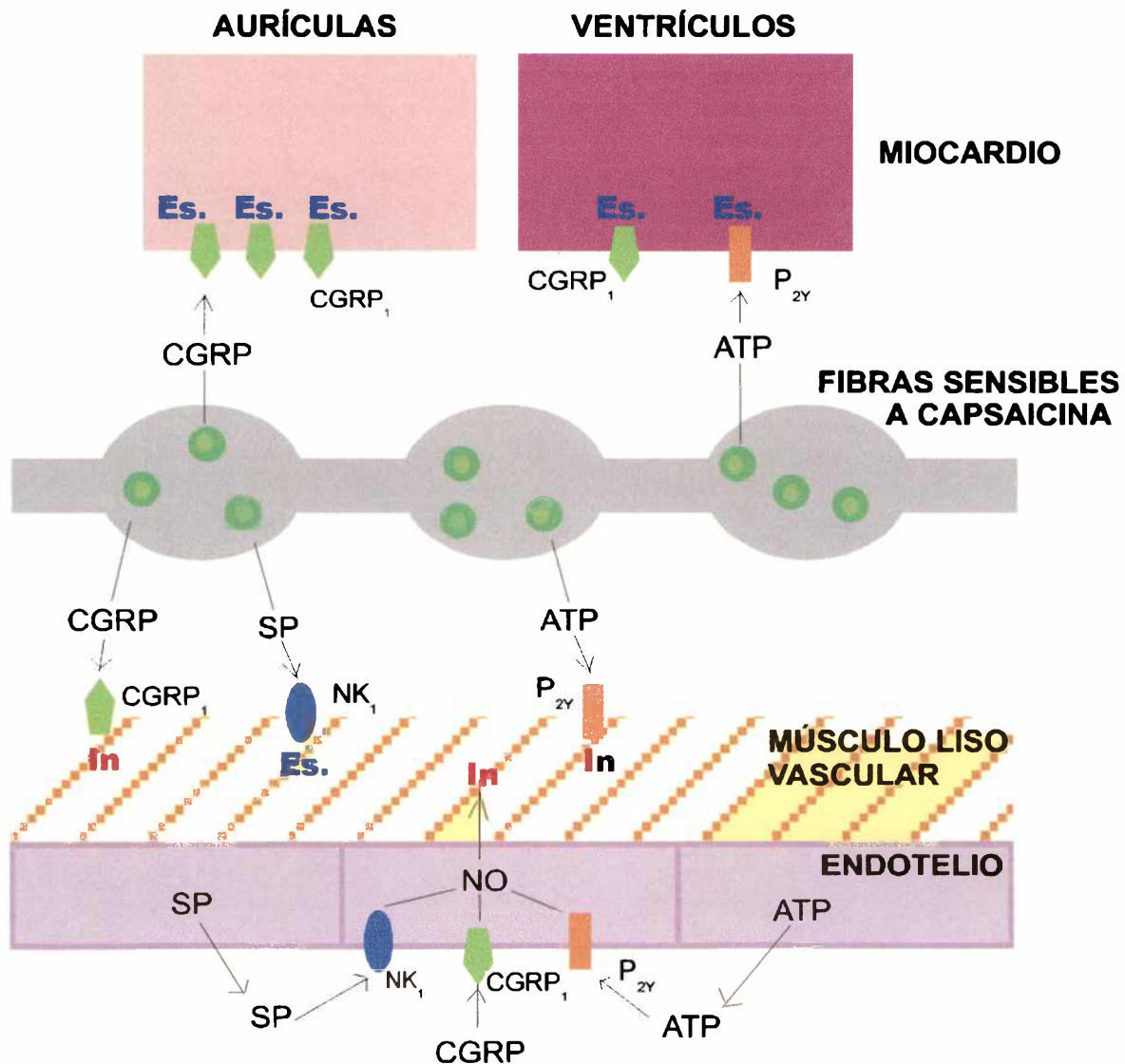


Figura 6: Diagrama esquemático de los efectos de los neurotransmisores de las fibras sensibles a la capsaicina sobre el corazón y los vasos. El péptido del gen relacionado con calcitonina (CGRP) y el trifosfato de adenosina (ATP) generan respuestas inotrópicas y cronotrópicas positivas (Es.: estimulación) sobre aurícula o ventrículo, actuando a través de receptores para CGRP de tipo 1 (CGRP₁) o de receptores purinérgicos de tipo 2Y (P_{2Y}), respectivamente. En la mayoría de los vasos sanguíneos el CGRP produce vasodilatación independiente del endotelio (In.: inhibición) aunque existen vasos donde el efecto es dependiente del mismo. La vasodilatación (In.) producida por ATP es mediada por receptores P_{2Y} ubicados tanto en el músculo liso como en el endotelio. La sustancia P (SP) evoca tanto vasoconstricción (Es.) independiente del endotelio como vasodilatación (In.) dependiente del endotelio vía receptores de neuroquinina de tipo 1 (NK₁).

La capsaicina produce vasodilatación de las vénulas grandes en el músculo estriado de rata por liberar CGRP, el cual tiene tanto una acción directa (igual que en las arteriolas) como una acción indirecta mediada por la activación de la síntesis del factor relajante endotelial (78).

4-2-4 Modulación de las fibras sensitivas

En forma similar a lo que ocurre en las terminaciones de las fibras simpáticas y parasimpáticas, las terminaciones de las fibras aferentes sensibles a la capsaicina poseen receptores específicos para diferentes sustancias, cuya activación produce cambios en la excitabilidad, con lo cual regulan la cantidad de neurotransmisor liberado. El GABA, la adrenalina, la neurotensina, la 5-HT y diversos mediadores inflamatorios desarrollan respuestas cardioexcitatorias por activación de los nervios sensitivos (81). Por otra parte, estas fibras también son reguladas por receptores inhibitorios propios de la terminal nerviosa tanto en el corazón como en el sistema vascular. Así, en el lecho mesentérico de rata, el CGRP a través de receptores presinápticos regula su liberación por un mecanismo de retroalimentación negativo (82) y el ATP (83) y el NO (84) inhiben la liberación de los neurotransmisores de las terminaciones de las fibras aferentes sensitivas. El ATP posee el mismo efecto de inhibir la liberación de los neurotransmisores de las fibras sensitivas sensibles a la capsaicina en aurícula aislada de cobayo (67, 85), y los péptidos opioides lo hacen tanto en el corazón (86) como en los vasos (87, 88). En la aurícula aislada de rata, la simpatectomía que resulta de la administración prolongada de guanetidina produce un aumento de la densidad de las fibras sensibles a capsaicina e induce la desensibilización específica de los receptores de CGRP. En contraste, una disminución de la densidad de dichas fibras por tratamiento de ratas neonatas con capsaicina no genera una mayor respuesta al CGRP (89).

De todo lo expuesto anteriormente, se evidencia que las fibras sensibles a la capsaicina ejercen junto con los sistemas simpático y parasimpático el control

autonómico de la función cardiovascular; existiendo además, diversas interacciones entre ellos (Fig 7). Los neurotransmisores simpáticos como la NA (receptores α_2), el ATP (o la adenosina) (receptores P_1) y el NPY pueden inhibir la neurotransmisión de las fibras aferentes sensitivas del sistema cardiovascular. Sin embargo, en la aurícula aislada de cobayo (90) y en el lecho mesentérico de rata (91) los neuropéptidos SP, CGRP y NKA no modulan la neurotransmisión simpática. En aurícula aislada de rata, la denervación de las fibras sensibles a la capsaicina, mediante el tratamiento neonatal con capsaicina, no afecta la neurotransmisión simpática (92).

Existen interacciones bidireccionales entre las fibras parasimpáticas y las aferentes sensitivas. Por un lado, en el corazón de perro, el CGRP tiene acciones directas inhibitorias sobre las neuronas parasimpáticas intrínsecas (93, 94) y la SP activa la inervación cardíaca vagal (95) vía receptores NK_1 , que han sido encontrados en neuronas de corazón de cobayo (96). Por otro lado, existen receptores de acetilcolina del tipo nicotínicos en las terminales primarias sensitivas, en el ganglio de la raíz dorsal y en las vías nociceptivas centrales (97). Ha sido demostrada la estimulación de las fibras sensibles a la capsaicina a través de receptores nicotínicos en el corazón de cobayo (98) y en el lecho vascular mesentérico (99).

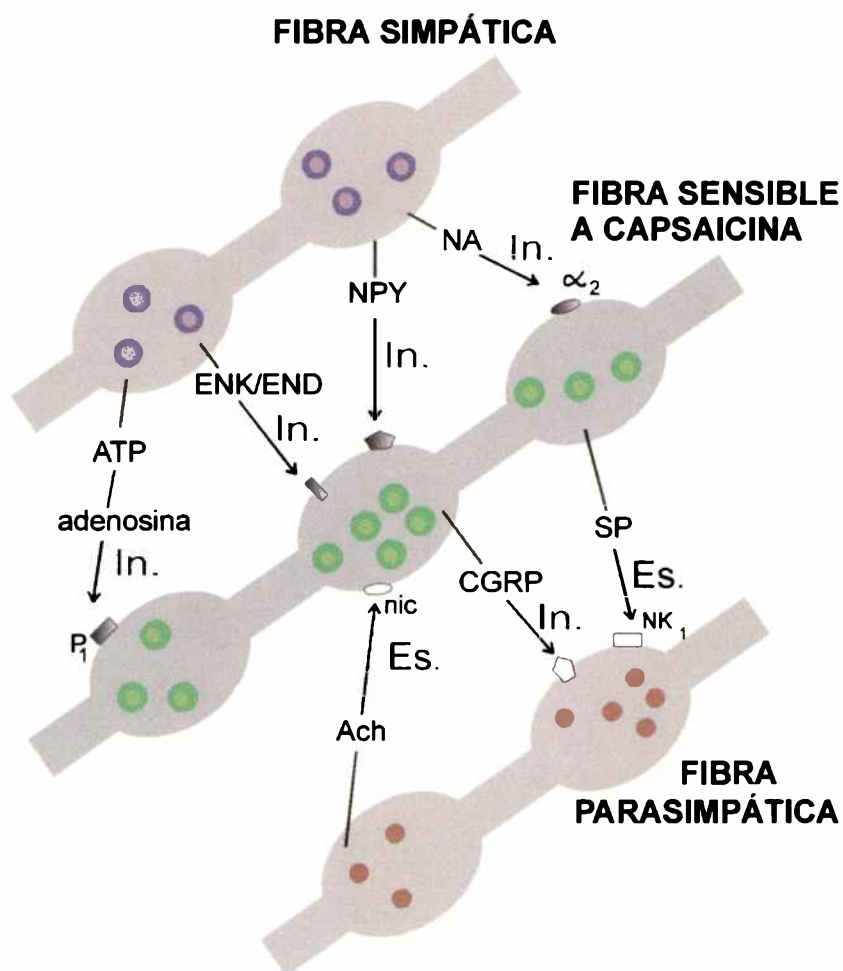


Figura 7: Esquema de las posibles interacciones entre las fibras sensibles a capsaicina y las fibras del sistema nervioso autónomo. La sigla (In.) indica inhibición y la (Es.) estimulación de la neurotransmisión tanto sensitiva como autonómica. En esta figura no han sido incluidas las interacciones de las fibras simpáticas y parasimpáticas entre sí. ATP= trifosfato de adenosina; P_1 = receptor purinérgico tipo 1; NK_1 = receptor a neuroquininas tipo 1; nic.= receptor nicotínico; α_2 = receptor adrenérgico tipo alfa₂; NPY= neuropéptido Y; CGRP= péptido del gen relacionado con calcitonina; ENK/END= encefalinas/endorfinas; SP= sustancia P; ACh= acetilcolina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los efectos de la capsaicina sobre la actividad cardíaca han sido estudiados en diferentes concentraciones, preparados y especies aportando resultados muy diversos que podrían deberse a que la capsaicina evoca respuestas mediadas por la liberación de neurotransmisores de las fibras primarias aferentes sensitivas y por acción directa sobre las células cardíacas.

Este trabajo planteó, en primer lugar, el estudio de los posibles efectos inotrópicos, cronotrópicos y lusitrópicos producidos por la estimulación de fibras nerviosas sensibles a la capsaicina en aurícula aislada de rata:

- A. Utilizando índices apropiados para caracterizar contractilidad y relajación.
- B. Separando los efectos inotrópicos independientes de los debidos a los cambios en el cronotropismo.
- C. Identificando los cambios inotrópicos debidos a la liberación de los neurotransmisores de los producidos por acción directa de la capsaicina sobre el miocito cardíaco.

El preparado utilizado, aurícula aislada de rata, permite la evaluación de los cambios en la frecuencia de contracción espontánea y de los cambios en la contractilidad tanto a frecuencia espontánea como constante; es por otra parte un preparado que asegura la detección de los efectos de la capsaicina secundarios a la liberación de neurotransmisores por estimulación de las fibras primarias aferentes sensitivas debido a que el tejido auricular está ricamente innervado por este tipo de fibras.

En segundo lugar, utilizando células aisladas de aurícula de rata, se investigaron efectos directos de la capsaicina sobre los flujos iónicos medibles por la técnica de patch-clamp.

1. Los protocolos de los experimentos mecánicos realizados en aurícula aislada de rata fueron diseñados para:

1.1. Determinar las respuestas inotrópicas y cronotrópicas a dosis acumulativas de capsaicina e identificar la concentración con efectos estimulantes.

1.2. Estudiar las respuestas excitatorias a la capsaicina en los siguientes aspectos:

1.2.1. Identificación de los efectos lusitrópicos que no han sido previamente descritos.

1.2.2. Verificación de la dependencia de efectos excitatorios de la capsaicina de la estimulación de las fibras primarias aferentes sensitivas e identificación del neurotransmisor CGRP como mediador de las respuestas.

1.2.3. Separación de los efectos inotrópicos y lusitrópicos de los cambios mecánicos inducidos por la variación en la frecuencia de contracción.

1.2.4. Posible regulación de los efectos excitatorios a través de la variación en la concentración de calcio intracelular obtenida por:

1.2.4.1. Cambios en la concentración de calcio externo.

1.2.4.2. Bloqueo de los canales de calcio de la membrana celular.

1.2.4.3. Bloqueo de los canales de potasio de la membrana celular.

- 1.3. Teniendo en cuenta que el pH ácido ha sido descrito como un activador de las fibras sensibles a la capsaicina, establecer la participación de dichas fibras en los cambios mecánicos producidos por la acidosis metabólica:
 - 1.3.1. A frecuencia de contracción espontánea.
 - 1.3.2. A frecuencia de contracción constante.
2. Los experimentos electrofisiológicos realizados en miocitos aislados de aurícula de rata y experimentos mecánicos utilizando aurícula izquierda fueron diseñados para:
 - 2.1. Identificar los efectos de la capsaicina sobre corrientes de sodio sensibles a tetrodotoxina, sobre la base de resultados previos en los que la droga produjo el enlentecimiento de la velocidad de despolarización de los miocitos cardíacos.
 - 2.2. Correlacionar los resultados electrofisiológicos obtenidos con el efecto inotrópico negativo de la capsaicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

1- EXPERIMENTOS MECÁNICOS

En los experimentos mecánicos se utilizaron ratas Sprague-Dawley de un peso aproximado entre 200 y 250 g. Las ratas fueron anestesiadas con eter sulfúrico, se extrajo rápidamente el corazón y se lo colocó en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato burbujeada con 5% de CO₂ y 95% de O₂ a temperatura ambiente. Se disecaron las aurículas latiendo en forma espontánea y se introdujeron en una cámara para órgano aislado conteniendo la misma solución salina pero termostatzada a 37 °C. El extremo libre de las aurículas se conectó a un transductor de fuerza (Letica TRI 201, Barcelona, España). Los protocolos incluyeron aurículas latiendo a frecuencia espontánea o aurículas estimuladas eléctricamente con electrodos de campo a una frecuencia superior a la espontánea. La fuerza isométrica desarrollada por las aurículas se registró mediante la introducción de la señal analógica amplificada del transductor en una plaqueta conversora analógica/digital (DT2801 Data Translation Inc., Malboro, MA) colocada en una computadora.

El uso de un software apropiado (Snapshot Storage Scope, EHM Data Corporation) permitió visualizar en la computadora los registros de fuerza desarrollada en función del tiempo durante los experimentos y guardar los archivos para su posterior análisis. La frecuencia de contracción espontánea y la fuerza desarrollada (F) se midieron en registros de 5 segundos cada 1 minuto. La primera derivada de la fuerza se obtuvo de registros de 0,25 segundos en los cuales se midió la máxima velocidad de contracción ($+dF/dt_{max}$) y la máxima

velocidad de relajación ($-dF/dt_{\max}$). Se calculó la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$ como un índice de los cambios lusitrópicos (Fig 8).

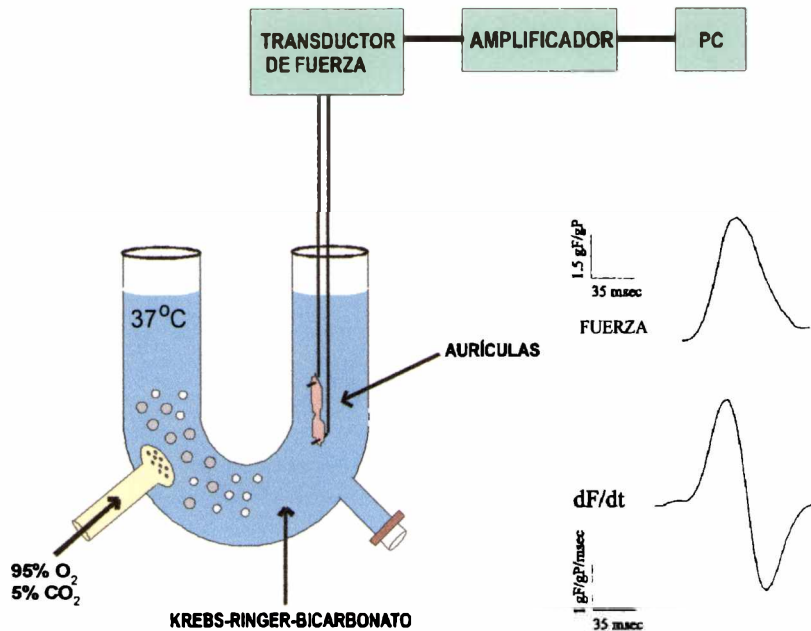


Figura 8: Equipo utilizado y registros obtenidos en los experimentos mecánicos.

La composición de la solución Krebs-Ringer-Bicarbonato fue la siguiente (en mM): ClK 5, SO_4Mg 1, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$, ClNa 111, CO_3HNa 24, Cl_2Ca 1,35 y glucosa 11. La solución fue equilibrada con 5% de CO_2 ($p\text{CO}_2$ de 40 mmHg) y 95% de O_2 (pH $7,41 \pm 0,01$). Las soluciones con mayor y menor calcio externo fueron obtenidas cambiando la concentración del Cl_2Ca de 1,35 a 2,70 y 0,65 mM respectivamente. Las soluciones con pH ácido ($6,73 \pm 0,01$, $n=28$) fueron obtenidas cambiando la concentración del CO_3HNa de 24 a 5 mM y equilibradas con 5% de CO_2 y 95% de O_2 .

Inmediatamente después de la conexión de las aurículas al transductor de fuerza, éstas fueron estiradas hasta alcanzar la fuerza desarrollada óptima y

luego estabilizadas durante 30 minutos cambiando la solución del baño cada 10 minutos. Antes de llevar a cabo los diferentes protocolos experimentales y luego del período de estabilización, se obtuvieron registros controles (cada 1 minuto) durante 10 minutos.

Drogas: Capsaicina sintética (Fluka), rojo de rutenio, CGRP₈₋₃₇, propranolol, diltiazem, tetraetilamonio (TEA), tetrodotoxina (TTX) y glibenclamida (Sigma) fueron disueltos en solventes apropiados. Todos los componentes de la solución Krebs-Ringer-bicarbonato y los solventes utilizados para las diferentes drogas fueron de grado analítico.

2- EXPERIMENTOS DE ELECTROFISIOLOGÍA

- Aislamiento de las células auriculares

Ratas Sprague-Dawley hembras fueron anestesiadas con eter sulfúrico y de manera inmediata se removió el corazón que fue colocado en una solución salina conteniendo bicarbonato y equilibrada con 5% de CO₂ y 95% de O₂ a temperatura ambiente. Las células auriculares fueron aisladas de ambas aurículas mediante digestión enzimática utilizando collagenasa y tripsina. El procedimiento está basado en el método descrito por Inscho et al. (100). Las aurículas fueron disecadas y transferidas a una solución de disociación (SD) conteniendo (en mM): 114 ClNa, 0,5 ClK, 1 SO₄Mg, 26 CO₃HNa, 22,4 Hepes, 5,5 glucosa y llevada a pH 7,6 con OHNa. El tejido fue incubado a 30°C durante 5 minutos en un medio SD conteniendo 0,1% de collagenasa. Luego se agregó una solución de tripsina (concentración final 0,15%) y se continuó la incubación durante 20 minutos. Hacia el final de este período de incubación, el tejido fue dispersado mecánicamente mediante un pipeteo suave. El tejido no dispersado se dejó sedimentar y el

sobrenadante que contiene las células aisladas en suspensión, fue removido y centrifugado; el pellet fue resuspendido en SD conteniendo 1 mg/ml de albúmina sérica bovina y 0,5 mg/ml de inhibidor de tripsina. Este procedimiento se repitió las veces que fueron necesarias hasta que se identificaron al microscopio las células auriculares aisladas.

- Registros de patch-clamp

Las células aisladas fueron colocadas en una caja de Petri conteniendo 2 ml de solución extracelular (SE) y observadas en un microscopio invertido (Zeiss-Telaval 3) equipado con un lente objetivo de 40X. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (~20°C). Para fijar el voltaje, en las células aisladas de aurícula, se utilizó la configuración estándar de célula entera de la técnica de "patch-clamp" (101). La resistencia de la micropipeta de vidrio utilizada para establecer el sello con la membrana celular, fluctuó entre 0,8 y 1 MΩ medidos en la SE. Las corrientes iónicas fueron medidas con un amplificador Axopatch 200 A (Axon Instruments, Foster City, CA). Las corrientes de la célula entera fueron filtradas a 5 kHz, digitalizadas (Digidata 1200 Axon Instruments, Foster City, CA) a una frecuencia de muestreo de 333 kHz y almacenadas en el disco rígido de una computadora para su posterior análisis.

La resistencia en serie y la capacitancia de la célula fueron medidas usando el circuito compensatorio del amplificador. La resistencia en serie fue compensada electrónicamente en un 60-70%. A lo largo de los experimentos se realizó un seguimiento de la misma y cuando cambió más de un 10% durante el registro, los datos fueron descartados.

Las células fueron perfundidas con SE que contenía (en mM): 90 cloruro de colina, 5 ClNa, 5 ClCs, 1 Cl₂Mg, 1 Cl₂Ca, 20 glucosa, 1 Cl₂Co, 10 Hepes; el pH

7,4 fue obtenido con la adición de OHNa y la composición de la solución intracelular de la micropipeta fue (en mM): 130 ClCs, 5 ATPNa₂, 1 Cl₂Mg, 10 glucosa, 1 EGTA, 20 Hepes; el pH fue llevado a 7,3 con adición de OHCs. Las corrientes iónicas activadas por voltaje en estas condiciones experimentales fueron eliminadas con 30 μ M de tetrodotoxina (TTX, Research Biochemicals Incorporated RBI, MA) o por sustitución iónica del ClNa en la SE con cloruro de colina, indicando que la corriente rápida de sodio fue la única corriente presente bajo nuestras condiciones experimentales. Los datos fueron analizados usando los software pClamp6 (Clamfit, Axon Instruments) y Origin (Microcal Software, Inc). La capsaicina sintética (Fluka) 0,4 y 4 μ M fue diluída en SE a partir de una solución madre de capsaicina 1 mM disuelta en metanol y perfundida en una pipeta con vías múltiples (2 ml/min) colocada cerca de la célula.

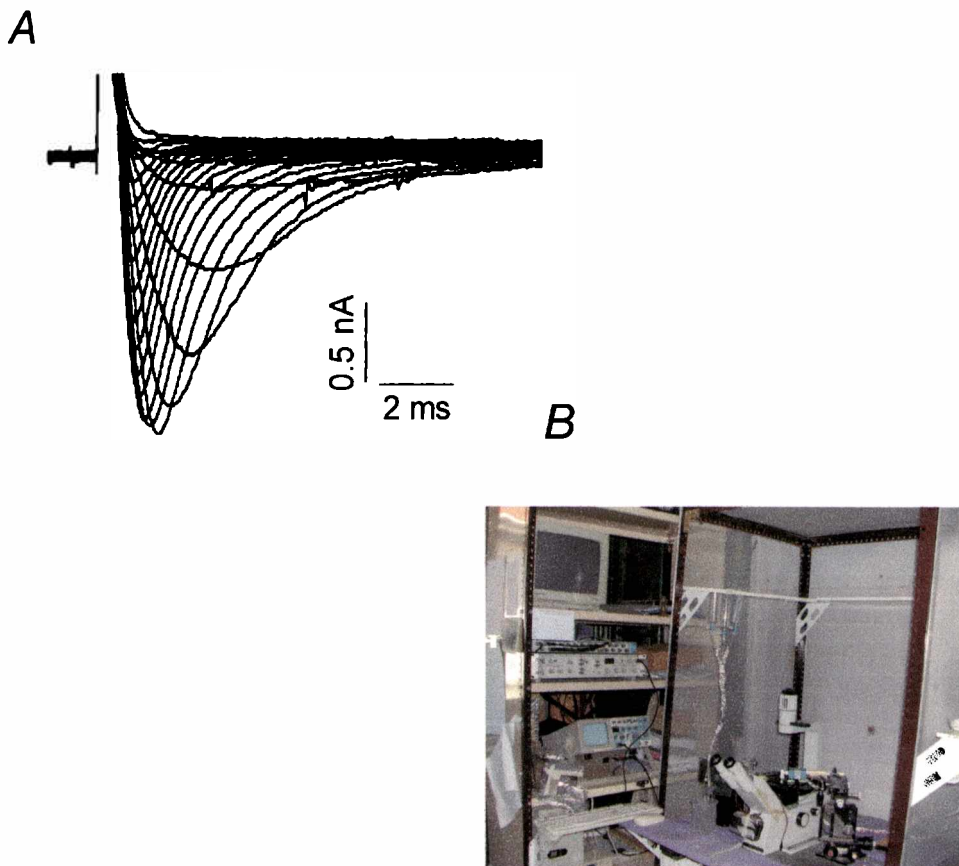


Figura 9: Familia de corrientes de Na⁺ activadas por voltaje obtenidas en configuración de célula entera mediante la técnica de patch-clamp (A). Equipo utilizado en dicha técnica (B).

RESULTADOS

RESULTADOS

1- EXPERIMENTOS MECÁNICOS

1-1 Curva dosis-respuesta a capsaicina

El primer protocolo fue realizado para estudiar las respuestas inotrópicas y cronotrópicas de aurícula aislada de rata a dosis crecientes de capsaicina. Las dosis fueron aditivas en el rango de 10^{-9} a 7×10^{-6} M y el tiempo de exposición para cada dosis fue de 8 minutos. Todos los resultados están expresados como la variación porcentual respecto al valor control.

- Respuestas inotrópicas

La respuesta sobre el inotropismo producida por dosis crecientes de capsaicina fue de tipo bifásica. Con la adición de capsaicina desde 10^{-9} a 7×10^{-8} M se observó una disminución progresiva de la fuerza desarrollada, llegando a una depresión máxima de 20 %. Esta depresión fue revertida a concentraciones de 2 y 7×10^{-7} M de capsaicina. A concentraciones mayores de 2×10^{-6} M la capsaicina produjo nuevamente una caída de la fuerza desarrollada, llegando a un máximo del 40 % (Fig 10a).

- Respuestas cronotrópicas

La capsaicina, a concentraciones extremas de 10^{-9} a 2×10^{-8} y de 2 a 7×10^{-6} M no modificó en forma significativa la frecuencia de contracción. Sin embargo a la concentración de 7×10^{-8} M de capsaicina, la frecuencia de contracción espontánea comenzó a aumentar y las concentraciones de 2 y 7×10^{-7} M produjeron un aumento significativo de la frecuencia de hasta un 10 % del control (Fig 10b).

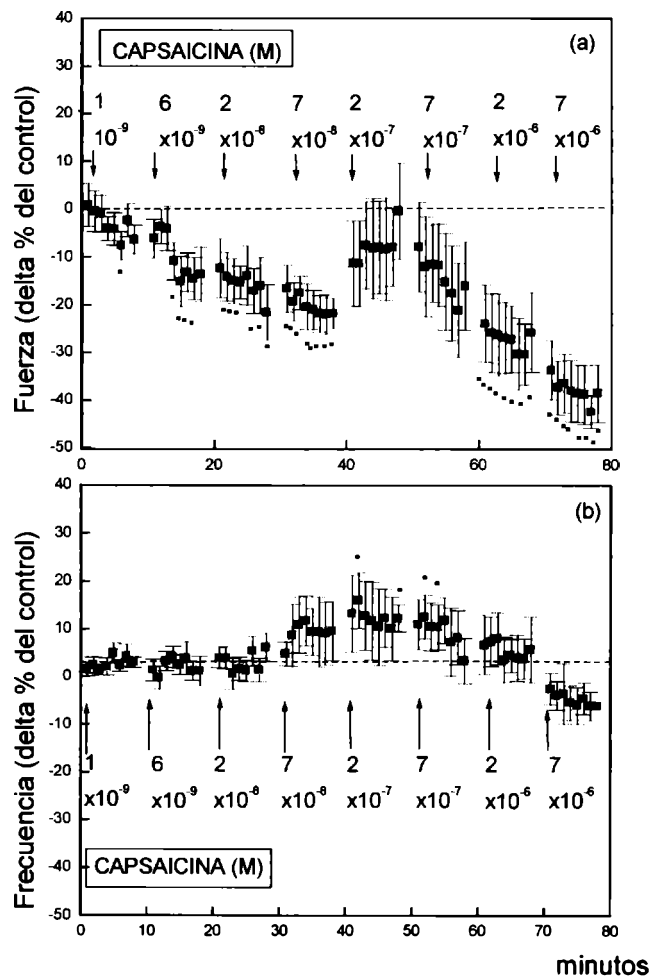


Figura 10: Efectos de dosis acumulativas de capsaicina sobre la fuerza desarrollada (a) y la frecuencia de contracción espontánea (b) en aurícula aislada de rata. Los valores son promedios de los cambios porcentuales \pm SEM (n=7). * indica diferencia significativa ($P < 0,05$).

Se realizaron experimentos controles con metanol, a concentraciones iguales a las utilizadas para vehiculizar cada dosis de capsaicina, verificando que no produjo cambios significativos ni en la fuerza desarrollada ni en la frecuencia de contracción espontánea (Figura 11a y b).

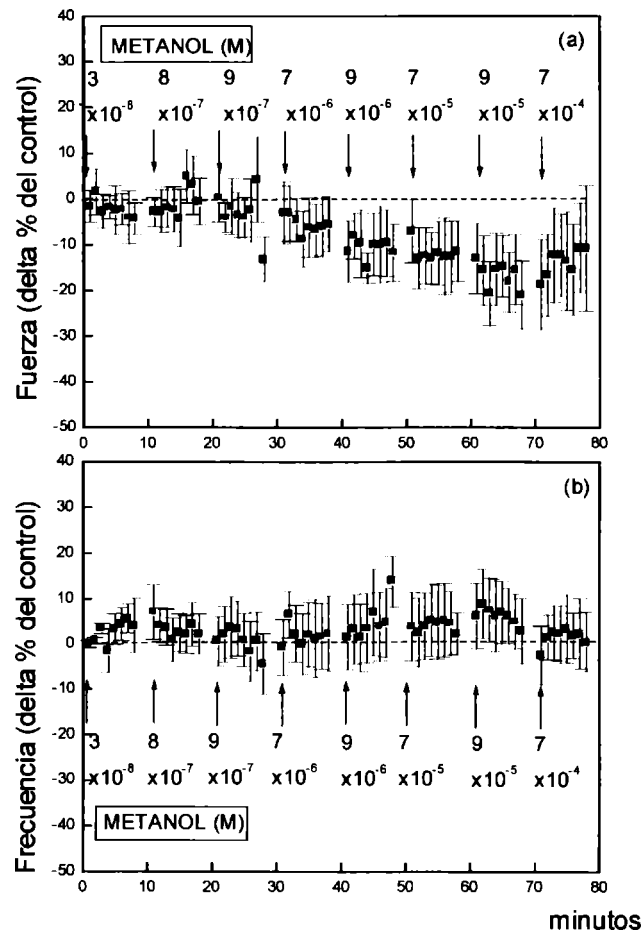


Figura 11: Experimentos controles con las mismas dosis de metanol utilizadas para vehiculizar la capsaicina, no modificaron significativamente ni la fuerza desarrollada (a) ni la frecuencia de contracción espontánea (b) en la aurícula aislada de rata. Los valores son promedios de los cambios porcentuales \pm SEM (n=5).

- Elección de la dosis de capsaicina con efectos excitatorios

De acuerdo a los resultados anteriores, se observó que a las concentraciones bajas (1×10^{-9} a 7×10^{-8} M) en las que capsaicina produjo una disminución de la fuerza desarrollada no se verificaron cambios en la frecuencia de contracción espontánea; sin embargo las dosis que revirtieron la caída de la fuerza desarrollada (2 y 7×10^{-7} M) produjeron simultáneamente un aumento de la frecuencia espontánea, es decir, que a pesar del fenómeno de la escalera negativo que se expresa en el corazón de rata, se detecta un aumento de la fuerza de contracción.

A bajas concentraciones de capsaicina (10^{-9} a 2×10^{-8} M) la relación negativa entre los cambios porcentuales en la fuerza desarrollada y la frecuencia de contracción espontánea fueron significativos (Fig 12a) pero no se verificaron a concentraciones mayores que 2×10^{-7} M (Fig 12b y tabla 1). Los resultados permiten sugerir que la depresión en la fuerza desarrollada a bajas concentraciones es una expresión de la escalera negativa mientras que a altas concentraciones el efecto depresor es independiente de los cambios en la frecuencia de contracción.

Caps.	10^{-9}	6×10^{-9}	2×10^{-8}	7×10^{-8}	2×10^{-7}	7×10^{-7}	2×10^{-6}	7×10^{-6}
r	-0.584	-0.456	-0.409	-0.003	-0.029	-0.114	-0.205	-0.240
P<	0.0001	0.0005	0.0039	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Caps.= concentración de capsaicina en M. N.S= sin diferencia estadística.

Tabla 1: Valores de los coeficientes de correlación y P para las pendientes de la regresión lineal obtenidas con pares de valores de los cambios porcentuales en la frecuencia de contracción y la fuerza desarrollada a diferentes concentraciones de capsaicina.

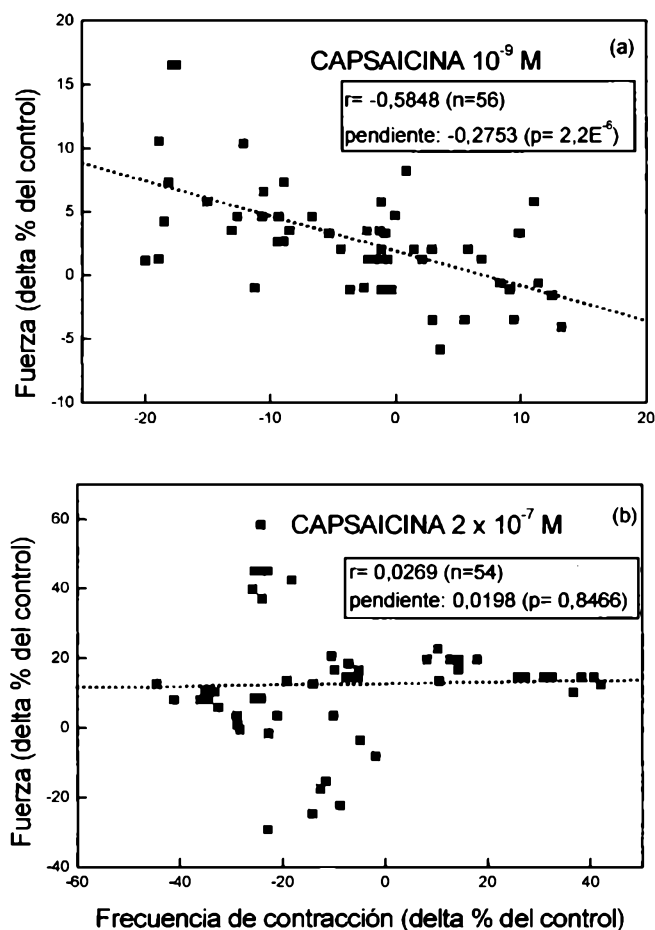


Figura 12: Regresión lineal entre los valores de los cambios porcentuales en la frecuencia de contracción y los valores de los cambios porcentuales en la fuerza desarrollada con capsaicina 10^{-9} M (a) y 2×10^{-7} M (b). r = coeficiente de correlación; el número de pares de datos utilizados para calcular la regresión es indicado en cada grupo; la pendiente de la regresión lineal en (a) es significativamente diferente de cero.

Conclusión: debido a que la capsaicina en concentraciones entre 2 y 7×10^{-7} M tuvo un efecto cronotrópico positivo y revirtió el efecto depresor sobre la fuerza desarrollada en aurícula aislada de rata, la dosis 5×10^{-7} M ($0,5 \mu\text{M}$) fue elegida para estudiar sus efectos cardioestimulatorios.

1-2 Respuestas a la dosis de 0,5 μ M de capsaicina

1-2-1 Efectos cronotrópicos, inotrópicos y lusitrópicos de la capsaicina 0,5 μ M a frecuencia de contracción espontánea. Participación de los neurotransmisores liberados de las fibras sensibles a la capsaicina.

Se estudiaron las respuestas cronotrópicas, inotrópicas y lusitrópicas de aurícula aislada de rata a la dosis única de capsaicina 0,5 μ M. El tiempo de exposición para esta dosis fue de 10 minutos. Todos los resultados están expresados como la variación porcentual respecto al valor control. En base a que la capsaicina induce la liberación de diferentes neurotransmisores de las terminales nerviosas sensitivas, se realizaron experimentos bloqueando la liberación de los mismos con rojo de rutenio. En estos protocolos se pretrataron las aurículas con rojo de rutenio 1 μ M durante 30 minutos y luego se ensayó la dosis de capsaicina 0,5 μ M en presencia del mismo durante 10 minutos. Los resultados están expresados como la variación porcentual respecto al valor control, que en este caso es el valor del último minuto del tratamiento con rojo de rutenio.

La adición de la dosis única de capsaicina 0,5 μ M produjo un aumento significativo de la frecuencia de contracción y de la fuerza desarrollada. El aumento de la frecuencia de contracción fue máximo ($10 \pm 3\%$) a los 2 minutos de exposición a la droga y luego cayó lentamente siendo de un $4 \pm 3\%$ a los 10

minutos. En presencia de rojo de rutenio la capsaicina no produjo cambios cronotrópicos con significación estadística (fig 13).

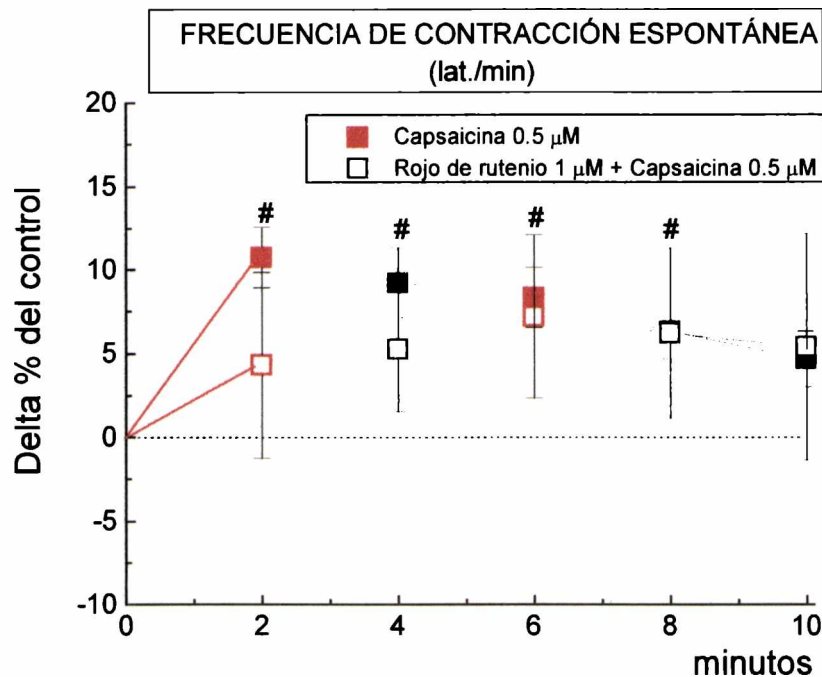


Figura 13: Cambios inducidos por capsaicina 0,5 μM y por capsaicina 0,5 μM en presencia de rojo de rutenio 1 μM sobre la frecuencia de contracción. # indica diferencia significativa de capsaicina respecto de cero ($P < 0,05$).

Los cambios en la fuerza desarrollada fueron más importantes y el aumento máximo alcanzó el 49 ± 12 % a los 2 minutos de exposición a capsaicina 0,5 μM , cayendo lentamente hasta llegar a un 20 ± 11 % a los 10 minutos. Para esta dosis de capsaicina también se evaluaron los parámetros $+dF/dt_{\text{max}}$ (máxima velocidad de la fuerza desarrollada) y $-dF/dt_{\text{max}}$ (máxima velocidad de relajación). Se observó un aumento significativo de $+dF/dt$ que fue máximo hacia los 2 minutos de exposición (50 ± 12 %) y se redujo a menos de la mitad

hacia los 10 minutos (20 ± 8 %). El parámetro $-dF/dt_{\max}$ se incrementó significativamente a lo largo de toda la exposición; el aumento máximo fue a los 2 minutos (56 ± 12 %) y luego cayó al 30 ± 2 % a los 10 minutos; la caída en la velocidad de relajación fue menor que la caída en la velocidad de contracción. Se calculó la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$ (índice lusitrópico) y se observó que disminuye a lo largo del tiempo de exposición a la capsaicina, evidenciando un efecto lusitrópico positivo (Fig 14).

Como se observa en la Fig 14 los efectos excitatorios producidos por capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ fueron abolidos por el pretratamiento con el rojo de rutenio. No se registraron cambios significativos en ninguno de los parámetros medidos, es decir en la fuerza desarrollada, en la máxima velocidad de fuerza desarrollada ($+dF/dt_{\max}$), en la máxima velocidad de relajación ($-dF/dt_{\max}$) y en la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$.

Conclusiones: la exposición a la dosis única de $0,5 \mu\text{M}$ de capsaicina en aurícula aislada de rata verificó el efecto cronotrópico positivo descrito anteriormente, produjo un efecto inotrópico positivo, demostrado por el aumento de la fuerza desarrollada y del $+dF/dt_{\max}$, y un efecto lusitrópico positivo, demostrado por la caída de la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$. El pretratamiento con un bloqueante de la liberación de neurotransmisores de las fibras sensitivas sensibles a capsaicina previno los efectos estimulatorios de $0,5 \mu\text{M}$ de capsaicina en aurícula aislada de rata.

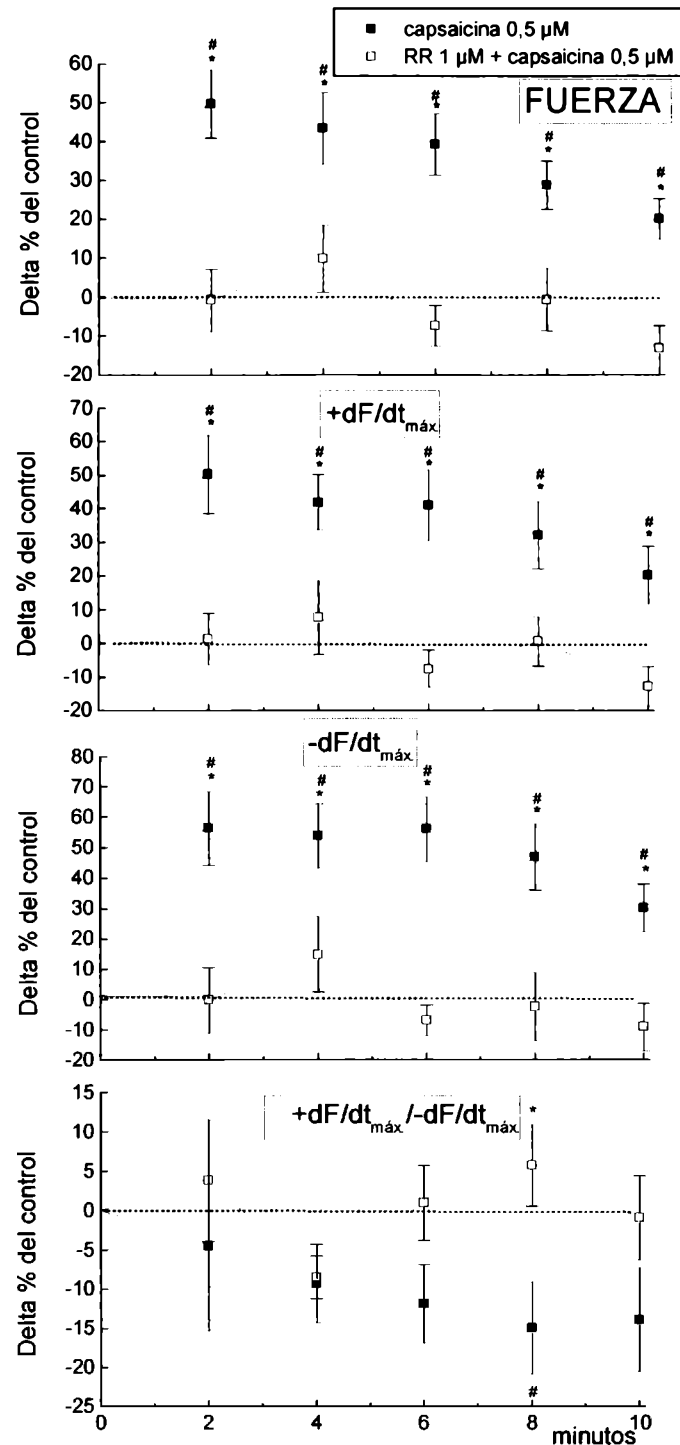


Figura 14: Cambios producidos por capsaicina 0,5 μ M en ausencia (n=24) y presencia de rojo de rutenio (RR) 1 μ M (n=5) sobre la fuerza desarrollada (primer panel), la máxima velocidad de la fuerza desarrollada (segundo panel), la máxima velocidad de relajación (tercer panel) y el índice lusitrópico, la relación $+dF/dt_{\max} / -dF/dt_{\max}$ (cuarto panel). # indica diferencia significativa de capsaicina con respecto al cero ($P < 0,05$) y * indica diferencia significativa de capsaicina respecto a rojo de rutenio + capsaicina ($P < 0,05$).

1-2-2 Respuestas a capsaicina 0,5 μ M en la aurícula latiendo a frecuencia de contracción constante. Efecto del bloqueo de los receptores de CGRP.

Para eliminar la participación del cambio de frecuencia espontánea sobre la respuesta contráctil se expusieron las aurículas aisladas de rata a la dosis de 0,5 μ M de capsaicina manteniendo la frecuencia de contracción constante (380 latidos/minuto) mediante la estimulación de campo eléctrico. El tiempo de exposición a la capsaicina fue de 10 minutos y los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al último minuto del período control. Teniendo en cuenta los resultados descriptos previamente, en los cuales un bloqueante de la liberación de los neurotransmisores inhibió los efectos excitatorios de la capsaicina, se realizaron protocolos utilizando un bloqueante específico de los receptores de CGRP (CGRP₈₋₃₇). Las aurículas aisladas de rata latiendo a frecuencia constante (380 latidos/minuto) se pretrataron con CGRP₈₋₃₇ durante 20 minutos y luego se adicionó capsaicina 0,5 μ M durante 10 minutos en presencia del CGRP₈₋₃₇. Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al último minuto de tratamiento con el bloqueante.

La dosis de capsaicina 0,5 μ M aumentó significativamente la fuerza desarrollada alcanzando un valor máximo de 40 ± 10 % al minuto 2 de exposición a la droga. Los parámetros $+dF/dt_{\max}$ y $-dF/dt_{\max}$ también se incrementaron significativamente llegando a un máximo de 42 ± 9 % (2 min.) y

41±11 % (4 min.), respectivamente; debido a que los valores alcanzados a lo largo de la exposición en las máximas velocidades de contracción y de relajación fueron semejantes, la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$ no se modificó. Comparando estos resultados con los de las aurículas latiendo espontáneamente, el incremento en la fuerza desarrollada y el del $+dF/dt_{\max}$ fueron semejantes y el del $-dF/dt_{\max}$ fue inferior, por lo cual se perdió el efecto lusitrópico positivo en respuesta a capsaicina (Fig 15).

Se ensayaron tres concentraciones del bloqueante específico de receptores para CGRP, 0,01, 0,1 y 1 μM y los efectos estimulatorios de capsaicina 0,5 μM sobre la contractilidad de las aurículas marcapaseadas sólo fueron suprimidos por la concentración 1 μM de CGRP₈₋₃₇.

En la figura 15 se observa que en presencia del CGRP₈₋₃₇ 1 μM , la capsaicina no produjo modificaciones en ninguno de los parámetros medidos (fuerza de contracción, $+dF/dt_{\max}$, $-dF/dt_{\max}$ y relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$) siendo todos los resultados significativamente diferentes de los obtenidos con capsaicina en ausencia del bloqueante.

Conclusiones: cuando se independizaron los efectos inotrópicos de los cronotrópicos (frecuencia de contracción constante), se observó que capsaicina 0,5 μM mantiene su efecto inotrópico positivo; sin embargo, el efecto lusitrópico positivo no fue significativo en estas condiciones experimentales. Los efectos estimulantes de capsaicina 0,5 μM sobre la contractilidad fueron suprimidos mediante el bloqueo de los receptores para CGRP con 1 μM de CGRP₈₋₃₇, lo que identifica a este neurotransmisor liberado

por la capsaicina como el responsable de las respuestas contráctiles en la aurícula aislada de rata.

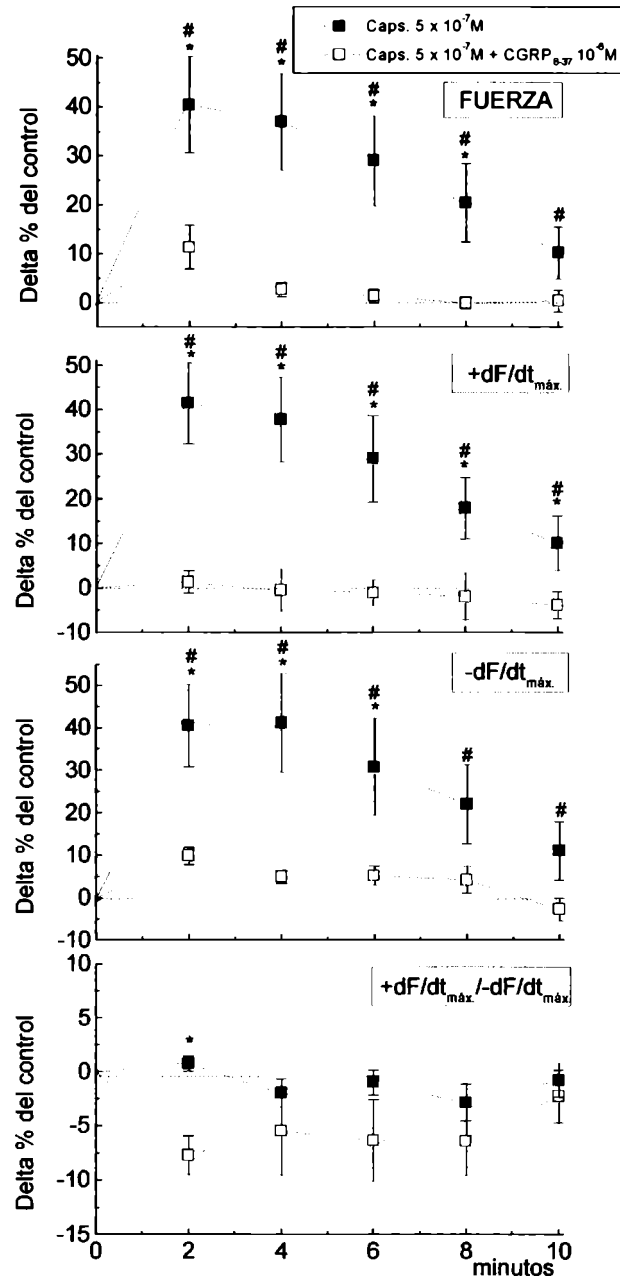


Figura 15: Cambios generados por capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ en ausencia y presencia del bloqueante $\text{CGRP}_{8-37} 1 \mu\text{M}$ sobre la fuerza desarrollada (primer panel), la máxima velocidad del desarrollo de fuerza (segundo panel), la máxima velocidad de relajación (tercer panel) y la relación $+dF/dt_{\text{máx.}}/-dF/dt_{\text{máx.}}$ (cuarto panel) en aurícula aislada de rata latiendo a frecuencia constante. # Indica diferencia significativa de capsaicina respecto a cero ($P < 0,05$) y * indica diferencia significativa de capsaicina respecto a $\text{CGRP}_{8-37} + \text{capsaicina}$ ($P < 0,05$).

1-2-3 Efectos excitatorios de capsaicina en condiciones de variación del calcio intracelular.

1-2-3-1 Cambios en la concentración de calcio externo y bloqueo de canales de calcio sensibles al voltaje.

Los efectos de capsaicina 0,5 μM se ensayaron a concentraciones de Ca^{2+} externo reducida a la mitad (0,67 mM) y duplicada (2,7 mM) con respecto al valor normal (1,35 mM). También se redujo la entrada de calcio al citosol mediante el bloqueo de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje con verapamil 1 μM . Los resultados se expresan como variaciones absolutas con respecto a los valores controles.

El aumento de la frecuencia de contracción producido por 0,5 μM de capsaicina fue similar en las tres concentraciones de calcio externo luego de 2 minutos de exposición, mientras que en presencia de verapamil el efecto cronotrópico positivo de capsaicina fue menor. A los 10 minutos de exposición de capsaicina en presencia de calcio externo elevado no se detectó un aumento significativo de la frecuencia de contracción espontánea (Fig 16).

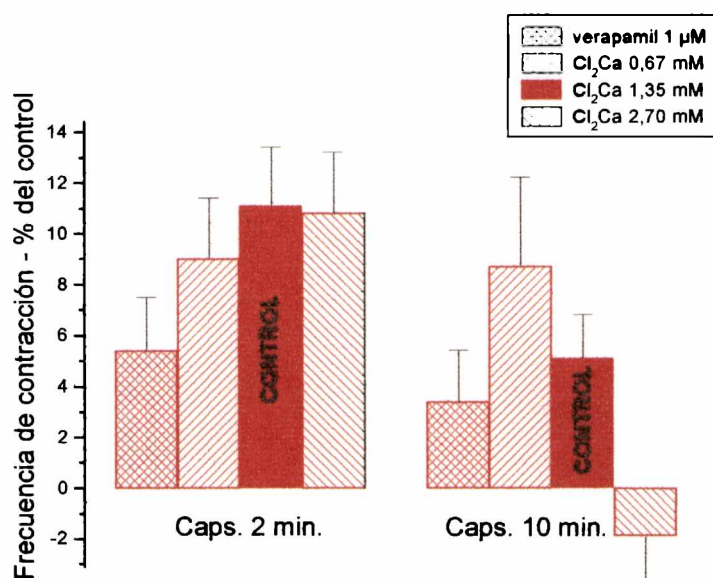


Figura 16: Efectos sobre la frecuencia de contracción espontánea en aurícula aislada de rata inducidos por la capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ en presencia de tres concentraciones de calcio externo: $0,67 \text{ mM}$ ($n=5$), $1,35 \text{ mM}$ ($n=6$) y $2,70 \text{ mM}$ ($n=6$) y verapamil $1 \mu\text{M}$ ($n=5$), luego de 2 y 10 minutos de exposición.

Los resultados mecánicos de las respuestas evocadas por capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ en presencia de las tres concentraciones de calcio externo y del bloqueante de la entrada de Ca^{+2} , se muestran en la Figura 17. El aumento de la contractilidad luego de 2 minutos de exposición a capsaicina fue menor en calcio bajo (menores incrementos en F y $+dF/dt_{\text{max}}$); los aumentos en la relajación ($-dF/dt_{\text{max}}$), en cambio, fueron similares en las tres concentraciones de calcio externo; la caída significativa en la relación $(+dF/dt_{\text{max}}/-dF/dt_{\text{max}})$ en calcio bajo evidencia un efecto lusitrópico positivo inducido por capsaicina. como manifestación de estas variaciones relativas en los parámetros de contracción y relajación. A los 10 minutos de exposición la comparación de los efectos mecánicos es compleja por la significativa reducción del aumento de frecuencia evocado por capsaicina a calcio alto. A pesar de la escalera positiva que resultaría de esta caída en la frecuencia, la contractilidad fue similar en los

tres grupos y la relajación estuvo significativamente deprimida a calcio alto (menor incremento de $-dF/dt_{max}$ y aumento de la relación $+dF/dt_{max}/-dF/dt_{max}$). Las respuestas evocadas por capsaicina en presencia de un bloqueante de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje mostraron un comportamiento similar a las producidas por la disminución en la concentración del calcio externo pero sin alcanzar significación estadística.

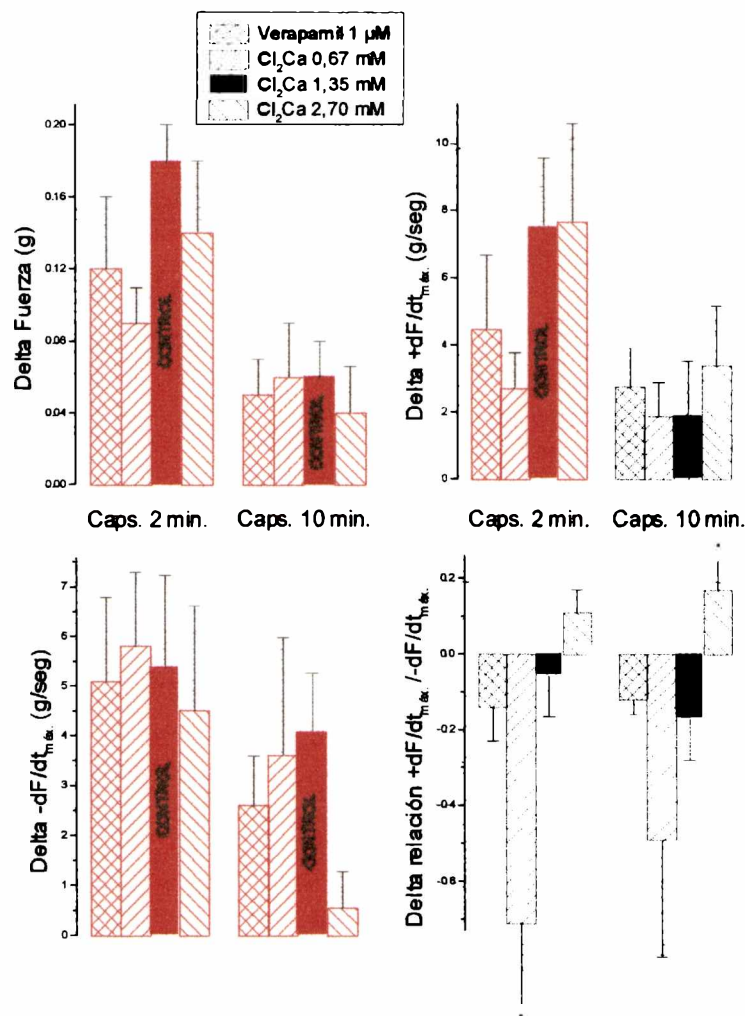


Figura 17: Efectos inducidos en aurícula aislada de rata por capsaicina $0,5 \mu M$ en presencia de tres concentraciones de calcio externo: $0,67 \text{ mM}$ ($n = 5$), $1,35 \text{ mM}$ ($n = 6$) y $2,70 \text{ mM}$ ($n = 6$) y verapamil $1 \mu M$ ($n = 5$), luego de 2 y 10 minutos de exposición, sobre la fuerza desarrollada, la máxima velocidad de desarrollo de fuerza ($+dF/dt_{max}$), la máxima velocidad de relajación ($-dF/dt_{max}$) y la relación $+dF/dt_{max}/-dF/dt_{max}$. * indica diferencia significativa con respecto al Cl_2Ca $1,35 \text{ mM}$ (control) ($P < 0,05$).

Conclusiones: las variaciones del calcio externo y el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} por los canales operados por voltaje no modificaron el efecto cronotrópico de capsaicina. Sólo la reducción del calcio externo reduce la respuesta inotrópica positiva a capsaicina y aumenta el efecto lusitrópico positivo.

1-2-3-2 Bloqueo de canales de potasio de la membrana celular

El bloqueo inespecífico de canales de K^+ con tetraetilamonio (TEA) 1 mM no modificó el efecto cronotrópico positivo de la capsaicina 0,5 μM a los dos minutos de exposición y lo disminuyó pero sin alcanzar significación estadística a los 10 minutos (Fig 18) sin embargo, deprimió significativamente la fuerza de contracción (Fig 19). El bloqueo específico de los canales de K^+_{ATP} con glibenclamida 10 μM produjo efectos similares a los de TEA con respecto la respuesta cronotrópica (Fig 18) pero fue mucho más efectivo sobre la respuesta inotrópica (Fig 19).

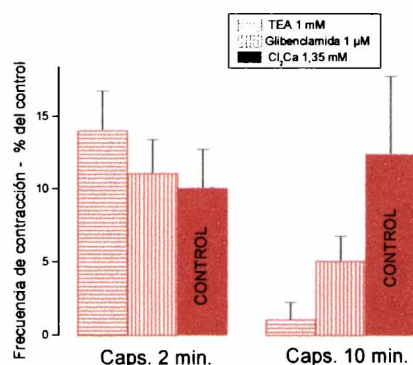


Figura 18: Efectos inducidos por capsaicina 0,5 μM en presencia de TEA 1 mM (n= 6) y glibenclamida 10 μM (n= 6) luego de 2 y 10 minutos de exposición sobre la frecuencia de contracción espontánea en aurícula aislada de rata.

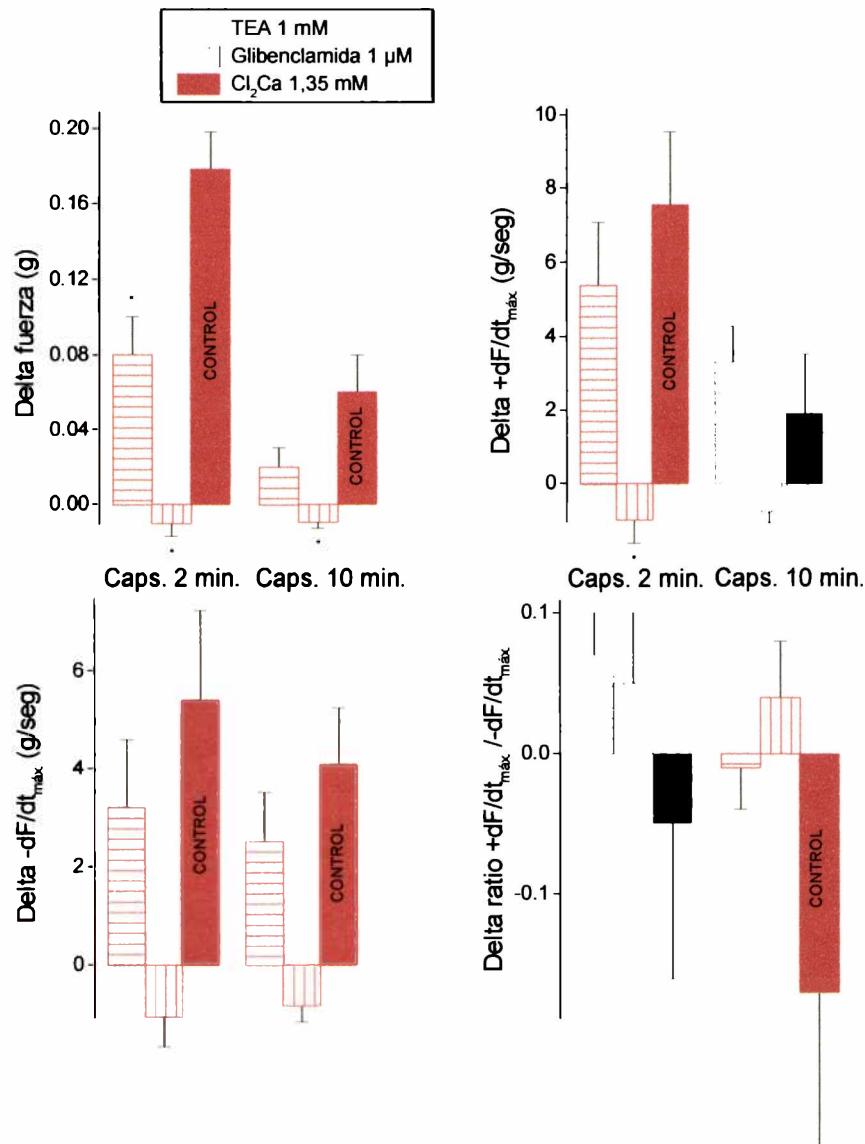


Figura 19: Efectos inducidos por capsaicina 0,5 μ M en presencia de TEA 1 mM (n= 6) y glibenclamida 10 μ M (n= 6) luego de 2 y 10 minutos de exposición, sobre la fuerza desarrollada, la máxima velocidad de desarrollo de fuerza (+dF/dt_{max}), la máxima velocidad de relajación (-dF/dt_{max}) y la relación +dF/dt_{max}/-dF/dt_{max}. * indica diferencia significativa con respecto a Cl₂Ca 1,35 mM (control, n= 6) (P<0,05).

Conclusiones: el efecto cronotrópico positivo de la capsaicina no fue modificado por la presencia de TEA ni de glibenclamida, sin embargo el efecto inotrópico positivo fue deprimido significativamente por la presencia de glibenclamida sugiriendo la participación de los canales de K_{ATP} en la respuesta inotrópica positiva inducida por la capsaicina.

1-3 Participación de las fibras sensibles a capsaicina en los cambios mecánicos producidos por la acidosis metabólica.

Está demostrado que el pH ácido es un estímulo similar a la capsaicina para las fibras sensitivas aferentes primarias en las cuales produce la liberación de neurotransmisores. El objetivo de esta parte del trabajo fue determinar la posible participación de los neurotransmisores liberados por las fibras sensitivas sensibles a la capsaicina en los cambios cronotrópicos, inotrópicos y lusitrópicos generados por la acidosis metabólica en la aurícula aislada de rata. Se realizaron protocolos a frecuencia de contracción espontánea para estudiar los efectos en condiciones fisiológicas, y a frecuencia de contracción constante, para independizar los cambios mecánicos de los generados por las variaciones en la frecuencia de contracción.

1-3-1 Experimentos a frecuencia de contracción espontánea

La Fig 20 presenta los resultados de disminución en la frecuencia de contracción espontánea que se producen por cambiar el valor del pH de 7,4 a 6,73 en distintas condiciones experimentales. No hubo diferencias significativas a lo largo de los diez minutos de la exposición a pH ácido entre los grupos que incluyeron: pretratamiento con capsaicina 0,5 μM , pretratamiento con rojo de rutenio 5 μM , pretratamiento con capsaicina y rojo de rutenio simultáneos y ausencia de pretratamiento. Basados en estos resultados, se analizaron los cambios en contractilidad excluyendo que los

mismos sean en parte debidos a cambios significativamente diferentes de la frecuencia de latido espontánea entre los grupos.

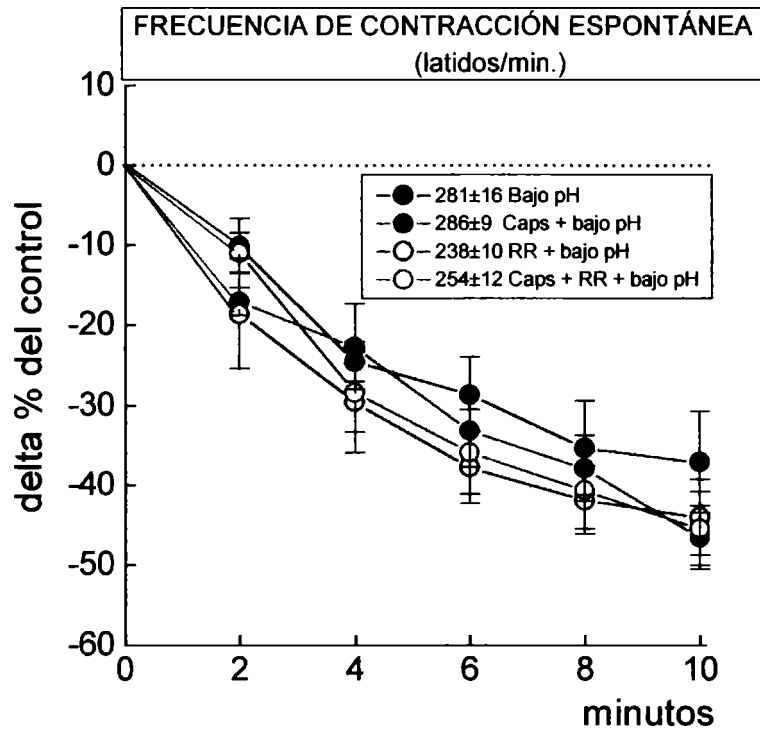


Figura 20: Disminución porcentual de la frecuencia de contracción espontánea de la aurícula aislada de rata expuesta a pH ácido ($n=5$), a pH ácido luego del pretratamiento con capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ ($n=11$), a pH ácido en presencia de rojo de rutenio $5 \mu\text{M}$ ($n=5$) y a pH ácido en presencia de rojo de rutenio $5 \mu\text{M}$ luego del pretratamiento con capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ ($n=5$). Los valores control de la frecuencia de latido figuran en el gráfico.

Se estudiaron las respuestas inotrópicas y lusitrópicas de la aurícula aislada de rata expuesta a pH ácido ($6,73 \pm 0,01$; $n=28$) durante 10 minutos. Los resultados están expresados como variación porcentual respecto al valor control de los parámetros medidos.

Como el pH ácido disminuyó la frecuencia de contracción espontánea, llegando a un máximo de -37 ± 6 % a los 10 minutos de exposición (Fig 20) y debido a que el músculo cardíaco de rata cuando disminuye la frecuencia de latido aumenta su fuerza de contracción, fue razonable esperar que los cambios mecánicos evocados por la caída del pH extracelular fueran el resultado neto entre el efecto inotrópico negativo desarrollado por la caída del pH (102) y el efecto inotrópico positivo debido al fenómeno de la escalera negativo.

Los resultados muestran que en la aurícula aislada de rata latiendo espontáneamente, la disminución del pH produce un efecto inotrópico positivo demostrado por un aumento máximo de la fuerza de contracción (34 ± 4 %) y del $+dF/dt_{\max}$ (33 ± 13 %); el incremento en $-dF/dt_{\max}$ no fue estadísticamente significativo y no se observaron cambios lusitrópicos positivos (Fig 21).

Para descartar la posibilidad de que las respuestas mecánicas producidas por el pH ácido fuesen por la activación de las fibras adrenérgicas, se ensayó la disminución del pH extracelular en presencia de $1 \mu\text{M}$ de propranolol. Bajo estas condiciones, la disminución del pH también produjo una respuesta inotrópica positiva con un aumento máximo de la fuerza de contracción de 37 ± 9 % y el $+dF/dt_{\max}$ de 26 ± 11 % ($n=4$). La caída de la frecuencia fue semejante a la obtenida en los experimentos anteriores, llegando a un máximo de -41 ± 9 % en el minuto 10 de exposición a bajo pH.

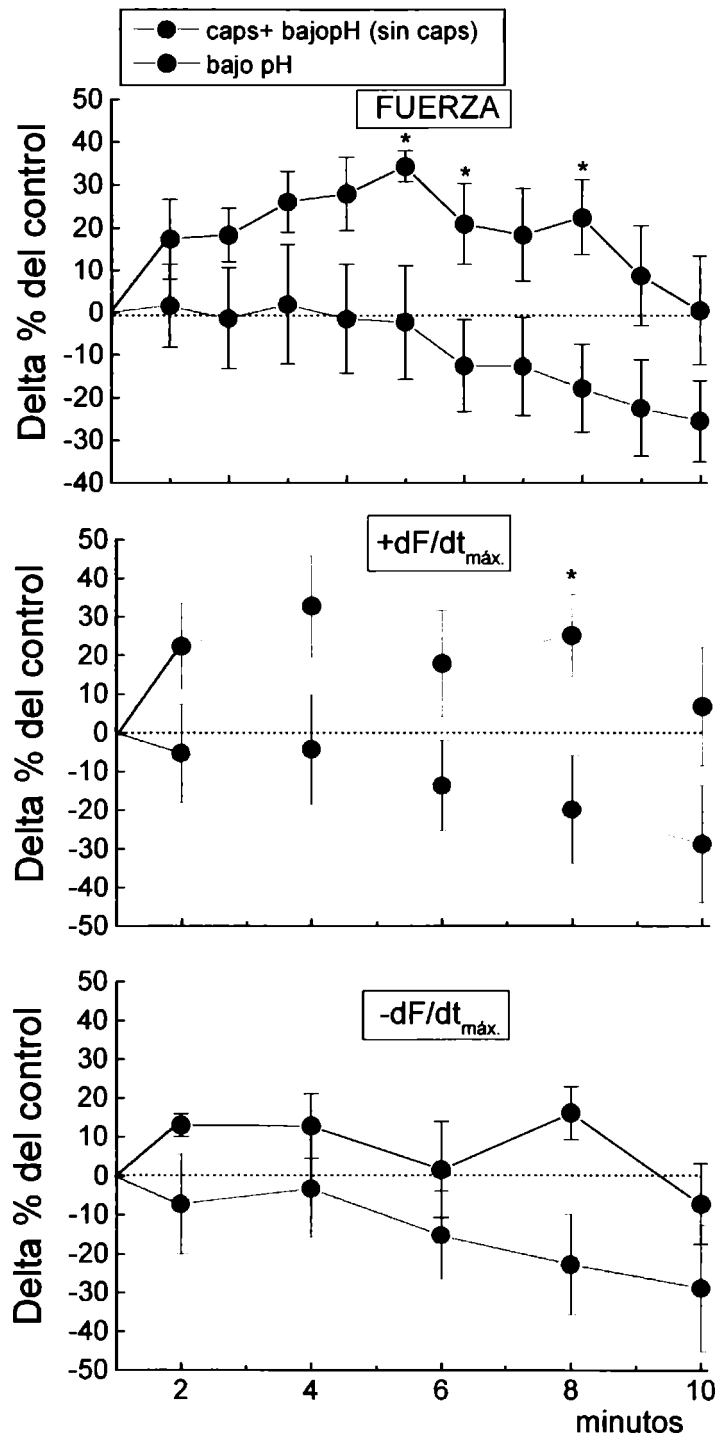


Figura 21: Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido sin pretratamiento ($n=12$) y luego del pretratamiento con capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ ($n=8$) en aurícula aislada de rata latiendo espontáneamente. Los valores controles para cada grupo fueron, respectivamente: (F)= $6,3 \pm 0,59$ y $3,98 \pm 0,73$ gF/gP, $+dF/dt_{\text{máx.}} = 0,94 \pm 0,16$ y $0,72 \pm 0,13$ gF/gP/mseg y $-dF/dt_{\text{máx.}} = 0,72 \pm 0,09$ y $0,5 \pm 0,06$ dF/gP/mseg. * indica diferencia significativa entre las medias de ambos grupos ($P < 0,05$) (ANOVA, Newman Keuls test).

Como muestra la Fig 21 en las aurículas aisladas de rata latiendo en forma espontánea y pretratadas con 0,5 μM de capsaicina, la disminución del pH no produjo aumentos ni de la fuerza de contracción ni del $+dF/dt_{\text{max}}$, a diferencia de lo observado en las aurículas sin pretratamiento con capsaicina. El $-dF/dt_{\text{max}}$ disminuyó pero sin alcanzar significación estadística.

Estos resultados muestran que el pretratamiento con capsaicina disminuye la contractilidad de las aurículas expuestas a pH ácido.

Dado que tanto la capsaicina como el pH ácido activan las fibras aferentes primarias sensitivas liberando distintos neurotransmisores se realizaron dos protocolos experimentales diferentes para determinar si dichos neurotransmisores participan en la respuesta contráctil al pH ácido o si la diferencia descrita previamente es un efecto directo de capsaicina sobre la respuesta contráctil de las aurículas expuestas a pH ácido.

- Efectos contráctiles inducidos por el pH ácido en presencia de rojo de rutenio 5 μM y en presencia de rojo de rutenio 5 μM y capsaicina 0,5 μM .

Un grupo de aurículas latiendo en forma espontánea fue pretratado durante 20 minutos con rojo de rutenio 5 μM y luego expuesto al pH ácido en presencia del mismo durante 10 minutos. El mismo protocolo pero con la adición de capsaicina simultáneamente al rojo de rutenio permitió comparar los resultados con respecto a un tercer grupo pretratado únicamente con

capsaicina. Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al minuto previo del cambio a pH ácido (Fig 22).

La disminución del pH en presencia del rojo de rutenio produjo aumentos máximos de la fuerza de contracción (71 ± 26 %) y del $+dF/dt_{\max}$ (71 ± 21 %). Si bien el $-dF/dt_{\max}$ aumenta lo hace en menor proporción que el $+dF/dt_{\max}$ y la relación $+dF/-dF_{\max}/-dF/dt_{\max}$ aumenta a lo largo de la exposición al pH ácido pero sin alcanzar significación estadística.

Los cambios inotrópicos producidos por el pH ácido en aurículas pretratadas con rojo de rutenio y capsaicina son muy semejantes a los descritos en el párrafo anterior. Se observó un aumento significativo de la fuerza desarrollada (máximo 91 ± 15 %) y del $+dF/dt_{\max}$ (máximo 78 ± 19 %) que superó al aumento de $-dF/dt_{\max}$ sin cambios significativos en la relación entre ambas velocidades (Fig 22).

Los valores de los parámetros que evalúan cambios en la contractilidad obtenidos durante la exposición a pH ácido en presencia de rojo de rutenio con o sin capsaicina simultánea, son significativamente mayores con respecto a los que produce el pH ácido luego del pretratamiento con capsaicina.

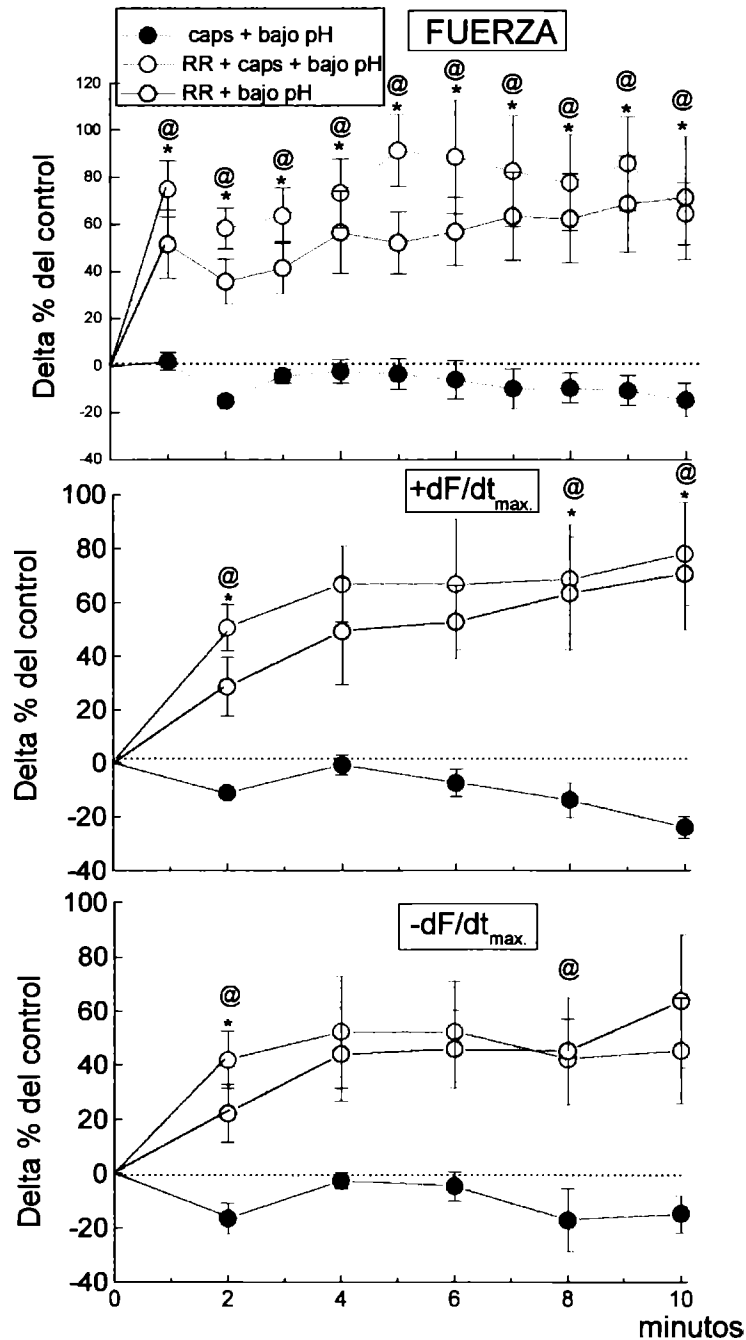


Figura 22: Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido con pretratamiento y presencia de capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ ($n=4$), de rojo de rutenio $5 \mu\text{M}$ ($n=5$) y de rojo de rutenio $5 \mu\text{M}$ (RR) + capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ ($n=5$) en aurícula aislada de rata latiendo espontáneamente. Los valores controles para los tres grupos experimentales fueron, respectivamente: $F= 3,05 \pm 0,82$; $3,18 \pm 0,91$ y $2,97 \pm 0,30$ gF/gP; $+dF/dt_{\text{max}}= 0,71 \pm 0,18$; $0,66 \pm 0,16$ y $0,71 \pm 0,06$ gF/gP/mseg y $-dF/dt_{\text{max}} = y -0,61 \pm 0,14$; $-0,5 \pm 0,11$ y $-0,53 \pm 0,06$ gF/gP/mseg. * indica diferencia significativa del pH ácido entre pretratamiento con capsaicina y pretratamiento con RR y @ indica diferencia significativa del pH ácido entre pretratamiento con capsaicina y pretratamiento con capsaicina + RR ($P < 0,05$) (ANOVA, Newman Keuls test).

Conclusiones: en aurículas aisladas de rata latiendo espontáneamente, la disminución del pH produjo un efecto inotrópico positivo que puede interpretarse como resultante del balance entre el efecto inotrópico negativo del pH ácido y el fenómeno de la escalera negativo, y que no puede atribuirse a la activación de fibras autonómicas adrenérgicas. En presencia de capsaicina 0,5 μM , se pierde el efecto inotrópico positivo generado por la caída de pH. Esto puede deberse a la acción de neurotransmisores liberados por capsaicina de las fibras sensitivas o a un efecto deletéreo “per se” de capsaicina sobre los miocitos auriculares. En presencia de rojo de rutenio y de capsaicina la caída de pH generó un efecto inotrópico positivo, es decir cuando capsaicina no puede liberar los neurotransmisores, no tiene efectos sobre la acción del pH ácido. Estos resultados descartan un efecto deletéreo de capsaicina “per se” en los resultados de disminución de la contractilidad por exposición a pH ácido.

1-3-2 Experimentos a frecuencia de contracción constante

- **Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido en aurículas pretratadas con capsaicina 0,5 μM y en aurículas pretratadas con rojo de rutenio 5 μM .**

Las aurículas aisladas de rata latiendo a frecuencia constante fueron pretratadas durante 10 minutos con capsaicina 0,5 μM y luego expuestas a pH ácido durante 10 minutos en ausencia de capsaicina. En estas

condiciones, las terminales nerviosas sensitivas serían estimuladas, primero por la capsaicina y subsecuentemente por el cambio de pH. Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al último minuto del pretratamiento con capsaicina.

En este protocolo la caída de pH extracelular provocó un efecto inotrópico negativo; la depresión tanto de la fuerza desarrollada como del $+dF/dt_{\max}$ llegó a un máximo de -43 ± 1 % y -45 ± 2 % respectivamente al minuto 10. El $-dF/dt_{\max}$ cayó a lo largo de la exposición al pH ácido (máximo -47 ± 2 %) (Fig 23) pero no se observaron cambios en la relación $+dF/-dF_{\max}/-dF/dt_{\max}$.

Otro grupo de aurículas aisladas de rata mantenidas a frecuencia de contracción constante fueron pretratadas con rojo de rutenio $5 \mu\text{M}$ durante 20 minutos y luego expuestas a pH ácido en presencia del colorante durante 10 minutos. Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al último minuto del tratamiento con rojo de rutenio.

Se observó que en presencia del rojo de rutenio, que bloquea la liberación de los neurotransmisores de las terminales nerviosas sensitivas, la disminución del pH produjo una depresión de la contractilidad (máxima caída de la fuerza de contracción -21 ± 6 % y del $+dF/dt_{\max}$ -24 ± 7 % a los 10 minutos) y relajación auricular (máxima caída de $-dF/dt_{\max}$ -20 ± 5 %) significativamente menor respecto al grupo anterior donde fue estimulada la liberación del neurotransmisor (Fig 23). Cuando fueron comparados, luego de los 10 minutos de exposición a pH ácido, los valores de la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$ se observó un aumento de la relajación en presencia del

rojo de rutenio (pretratamiento con capsaicina $4,4 \pm 1,6$ % vs. $-3,5 \pm 2,8$ %

en pretratamiento con rojo de rutenio respectivamente, $p < 0,05$).

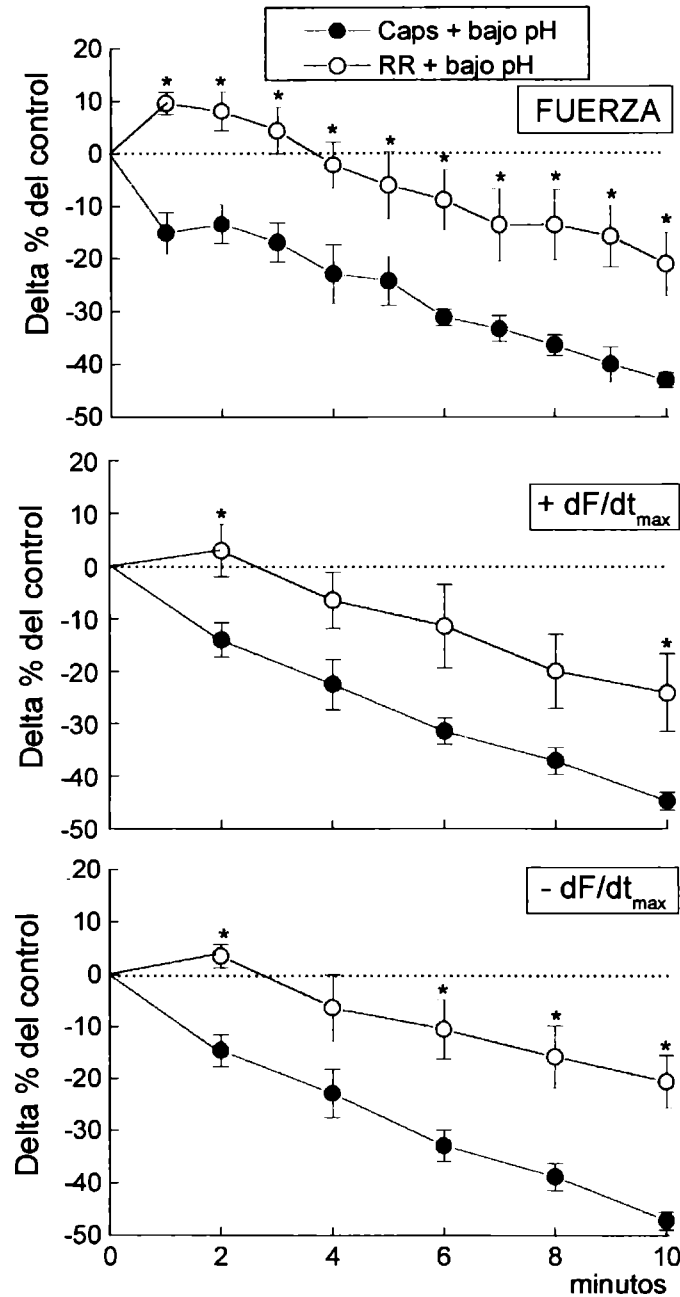


Figura 23: Cambios mecánicos inducidos por el pH ácido con pretratamiento de capsaicina $0,5 \mu\text{M}$ ($n=5$) y con pretratamiento y presencia de rojo de rutenio $5 \mu\text{M}$ ($n=6$) en aurícula aislada de rata latiendo a frecuencia de contracción constante. Los valores controles para pH ácido pretatado con capsaicina y pH ácido pretratado con RR fueron, respectivamente: (F)= $3,69 \pm 0,32$ y $4,09 \pm 1,11$ gF/gP; $+dF/dt_{\text{max}} = 0,38 \pm 0,03$ y $0,87 \pm 0,24$ gF/gP/mseg y $-dF/dt_{\text{max}} = -0,34 \pm 0,03$ y $-0,63 \pm 0,17$ gF/gP/mseg. * indica diferencia significativa entre las medias de ambos grupos ($P < 0,05$) (ANOVA, Newman Keuls test).

- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido y por el pH ácido en presencia de CGRP₈₋₃₇ 1 μ M.

Debido a que el rojo de rutenio inhibe la liberación de CGRP inducida por el pH ácido (27), fue posible postular que este neurotransmisor podría jugar un rol en la respuesta mecánica de la aurícula expuesta a pH ácido.

En la Fig 24 se muestran los resultados mecánicos en situación control (sin cambio de pH) y en dos protocolos con exposición a pH ácido, uno de ellos en presencia de CGRP₈₋₃₇ 1 μ M, un bloqueante específico de los receptores del CGRP. Los resultados están expresados como la variación porcentual de los parámetros medidos respecto a su valor control, el minuto previo al cambio de pH.

La disminución del pH en aurículas latiendo a frecuencia constante produjo un efecto inotrópico negativo que se verificó por la caída significativa, a partir del minuto 6 de exposición, tanto de la fuerza desarrollada como del $+dF/dt_{max}$, llegando a un máximo en el minuto 10 (-30 ± 6 % y -32 ± 6 %, respectivamente). Estos valores son menores que los producidos por el pH ácido en presencia de capsaicina (Fig 22), coincidiendo con los resultados obtenidos a frecuencia espontánea en el sentido de que capsaicina contribuye a deprimir la contractilidad durante la exposición a pH ácido. El $-dF/dt_{max}$ también disminuyó a lo largo de la exposición (máximo -39 ± 7 % al minuto 10) pero el lusitropismo no se vió afectado.

En el grupo control en el cual las aurículas latiendo a frecuencia constante fueron expuestas, luego del período control, a pH normal durante 10 minutos no se presentan cambios significativos en ninguno de los parámetros mecánicos medidos.

Las aurículas aisladas de rata marcapaseadas y pretratadas con CGRP₈₋₃₇ 1 μ M durante 10 minutos fueron expuestas a pH ácido en presencia del bloqueante durante 10 minutos adicionales. Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al último minuto del pretratamiento con CGRP₈₋₃₇.

Los resultados coinciden con los obtenidos en presencia del rojo de rutenio, es decir en presencia del bloqueante, se atenuaron significativamente la depresión de la fuerza de contracción, del $+dF/dt_{\max}$ y del $-dF/dt_{\max}$ (máximo -9 ± 1 %, -18 ± 5 % y -7 ± 2 % respectivamente al minuto 10) comparando con las caídas en estos parámetros producidas por el pH ácido en ausencia del mismo (Fig 24).

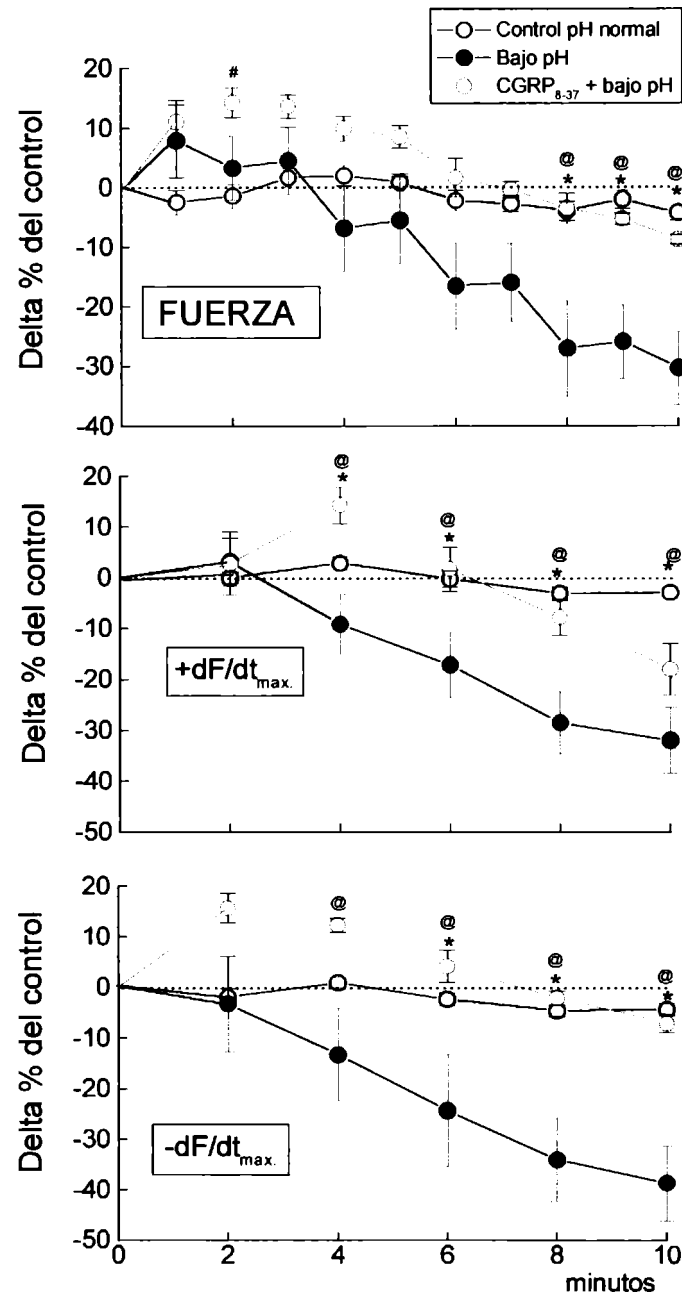


Figura 24: Cambios mecánicos inducidos por el pH ácido ($n=6$), por el pH ácido con pretratamiento y presencia de CGRP₁₋₃₇ 1 μ M ($n=4$) y en experimentos controles sin cambios de pH ($n=8$) en aurícula aislada de rata latiendo a frecuencia de contracción constante. Los valores controles para pH ácido, para pH ácido con pretratamiento con CGRP₈₋₃₇ y ausencia de cambios de pH fueron, respectivamente: (F)= $3,76 \pm 0,56$; $4,91 \pm 0,45$ y $7,23 \pm 0,57$ gF/gP; $+dF/dt_{max} = 0,39 \pm 0,05$; $0,51 \pm 0,04$ y $0,73 \pm 0,06$ gF/gP/mseg y $-dF/dt_{max} = -0,40 \pm 0,08$, $-0,44 \pm 0,04$ y $-0,69 \pm 0,06$ gF/gP/mseg. * indica diferencia significativa entre control y pH ácido, # entre control y CGRP₈₋₃₇ + pH ácido y @ entre pH ácido y CGRP₈₋₃₇ + pH ácido ($P < 0,05$) (ANOVA, Newman Keuls test).

- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido en aurículas pretratadas con capsaicina 0,5 μ M seguido de dos lavados consecutivos

Si el CGRP liberado por capsaicina se halla presente y/o sus efectos son perdurables durante la exposición al pH ácido contribuyendo a deprimir la contractilidad auricular es posible que la exposición a pH ácido luego de pretratar las aurículas con capsaicina y realizar dos lavados consecutivos con Ringer sin capsaicina elimine este efecto. Aurículas aisladas de rata mantenidas a frecuencia de contracción constante fueron pretratadas con capsaicina 0,5 μ M, luego expuestas dos veces consecutivas a solución Ringer sin capsaicina durante 10 minutos cada vez y por último a pH ácido durante otros 10 minutos (n=4). Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto a los valores registrados en el último minuto del segundo lavado.

Los efectos mecánicos provocados por el pH ácido luego del pretratamiento con capsaicina y los dos lavados consecutivos fueron similares a los de las aurículas expuestas únicamente al pH ácido. Los cambios porcentuales a los 10 minutos de exposición al pH ácido de los dos protocolos fueron -29 ± 9 vs -30 ± 6 % para la fuerza desarrollada, -30 ± 2 vs -32 ± 6 % para $+dF/dt_{\max}$ y -33 ± 12 vs -38 ± 7 % para $-dF/dt_{\max}$.

- Efectos mecánicos inducidos por el pH ácido en aurículas pretratadas con isoproterenol 0,01 μ M

Teniendo en cuenta que el CGRP aumenta los niveles de AMPc intracelular se trató de imitar sus efectos sobre las respuestas mecánicas auriculares al pH pretratando las preparaciones con isoproterenol 0,01 μ M durante 10 minutos y luego exponiéndolas a pH ácido durante 10 minutos. Los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto a los valores del último minuto de exposición al isoproterenol.

Se observó que la disminución del pH luego del pretratamiento con isoproterenol disminuyó la fuerza de contracción, el $+dF/dt_{\max}$ y el $-dF/dt_{\max}$ de manera similar a lo obtenido con el pretratamiento con capsaicina (efecto máximo al minuto 10: $F = -45 \pm 11 \%$ vs $-43 \pm 1 \%$, $+dF/dt_{\max} = -50 \pm 10 \%$ vs $-45 \pm 2 \%$ y $-dF/dt_{\max} = 53 \pm 9 \%$ vs $47 \pm 2 \%$).

Conclusiones: en aurículas mantenidas a frecuencia constante, es decir, en las que no hay cambios mecánicos generados por cambios en la frecuencia de contracción, se evidenció un efecto inotrópico negativo inducido por el pH ácido. Los resultados demuestran que de los diferentes neurotransmisores liberados por la capsaicina de las terminales nerviosas sensitivas, el CGRP es el que contribuye a deprimir la contractilidad de las aurículas expuestas a pH ácido, posiblemente por un mecanismo

relacionado con el aumento del AMP_c que produce este neurotransmisor ya que el pretratamiento con isoproterenol evoca efectos similares.

2- EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS

2-1 Efectos de la capsaicina sobre corrientes de sodio sensibles a tetrodotoxina.

La estabilidad de la corriente control fue evaluada luego de ser obtenida la configuración de célula entera, aplicando varios pulsos únicos despolarizantes de 20-ms de duración desde un potencial de mantenimiento de -100 mV hasta un potencial de -40 mV. Luego se perfundió con un medio extracelular conteniendo capsaicina 0.4 μ M o 4 μ M, repitiendo a cada concentración el mismo protocolo que en la situación control. Ambas concentraciones de capsaicina redujeron significativamente la amplitud de la corriente macroscópica de sodio (I_{Na}) siendo la disminución del 49 ± 7 % para 0.4 μ M ($n=11$, $P<0.05$, test de t de Student para muestras apareadas) y del 72 ± 13 % para 4 μ M ($n=4$, $P<0.05$, test de t de Student para muestras apareadas) (Fig 25).

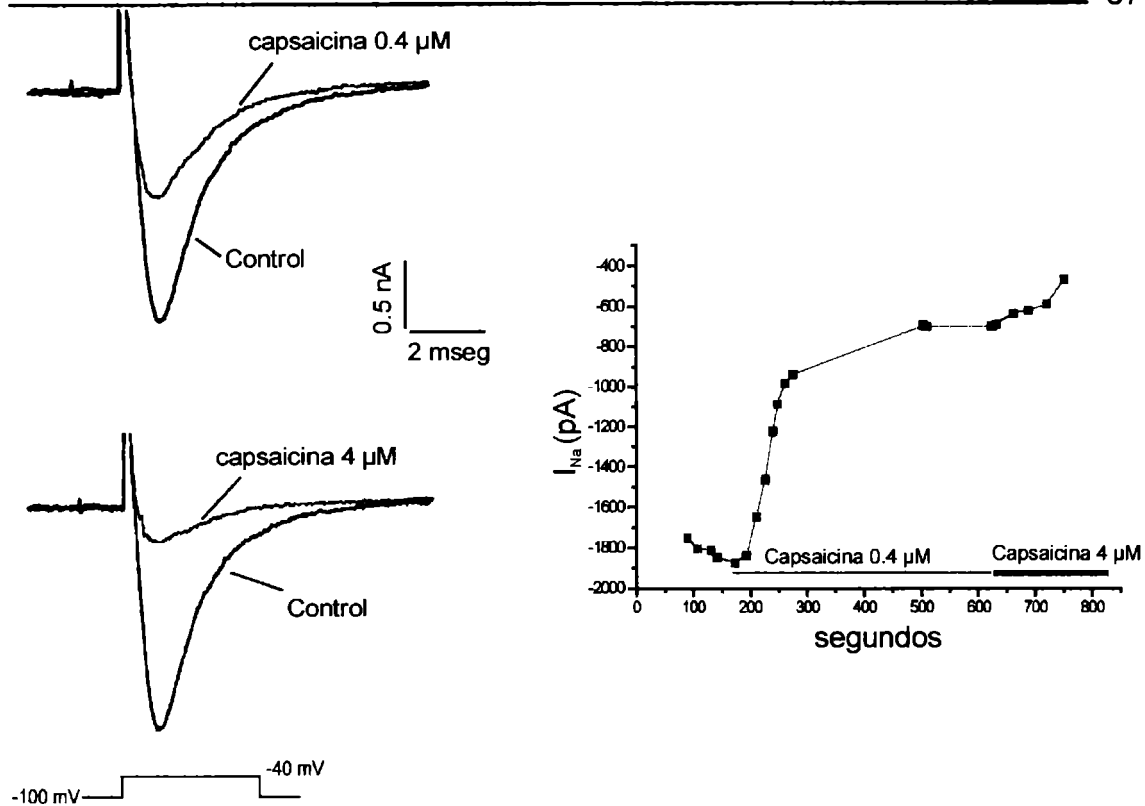


Figura 25: Efectos de capsaicina 0,4 y 4 μM sobre la I_{Na} inducida por un pulso despolarizante desde -100 mV a -40 mV en las células auriculares de rata. El panel de la izquierda muestra registros superpuestos en condiciones control y en presencia de la capsaicina. El panel de la derecha representa el efecto bloqueante de capsaicina 0,4 y 4 μM sobre el pico de la corriente de Na a un potencial de -40 mV en función del tiempo.

Con el fin de investigar si la capsaicina producía un bloqueo dependiente del estímulo en adición al bloqueo tónico observado, se realizó el siguiente protocolo: en células perfundidas con SE, se aplicaron 20 pulsos despolarizantes de 1 segundo en forma continua (5 Hz) desde un potencial de mantenimiento (PM) de -100 mV hasta un potencial de -20 mV; una vez interrumpido el tren de pulsos se perfundió capsaicina 0.4 μM . El bloqueo tónico se ensayó con pulsos que despolarizaron desde un PM de -100 mV hasta -40 mV (uno cada 30 segundos) y cuando se obtuvo una inhibición estable de la I_{Na} , se aplicaron nuevamente 20 pulsos despolarizantes hasta -20

mV a una frecuencia de 5 Hz. Los resultados obtenidos utilizando este protocolo mostraron que durante la aplicación de los pulsos despolarizantes en ausencia de capsaicina, la amplitud de la I_{Na} no cambió y que capsaicina 0.4 μM no produjo ningún bloqueo adicional dependiente del estímulo.

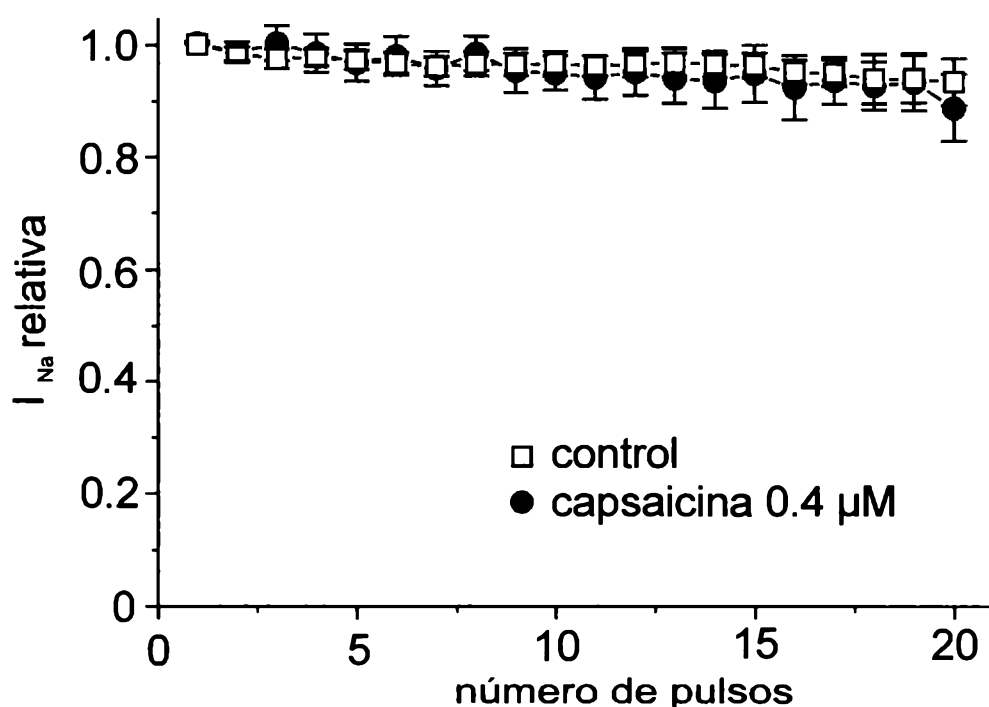


Figura 26: La capsaicina 0,4 μM no produce ningún bloqueo adicional del tipo dependiente del uso sobre la I_{Na} cuando un tren de pulsos despolarizantes hasta -20 mV fue aplicado a una frecuencia de 5 Hz. La amplitud de I_{Na} está expresada como un valor relativo al de I_{Na} control y graficada en función del número de pulsos. Los puntos son valores promedios \pm error estándar en la condición control ($n=6$) y en presencia de un bloqueo tónico estable inducido por capsaicina 0,4 μM ($n=5$).

- Efectos de capsaicina sobre la inactivación de la I_{Na}

Se estudió el fenómeno de inactivación de la I_{Na} realizando el mejor ajuste de la fase de decaimiento de la I_{Na} generada con pulsos despolarizantes desde un PM de -100 mV a -40 mV. La fase de decaimiento de la I_{Na} se ajustó

mediante una ecuación que describe una función exponencial simple obteniendo el valor de la constante del tiempo de inactivación (τ_{inact}). En la Fig 27 se muestra que la capsaicina 0.4 μ M, a -40 mV, aumentó significativamente el valor del τ_{inact} de la I_{Na} (control, 1.53 ± 0.16 msec; capsaicina, 1.88 ± 0.23 msec; diferencia, 0.35 ± 0.11 n=11, test de t de Student para muestras apareadas).

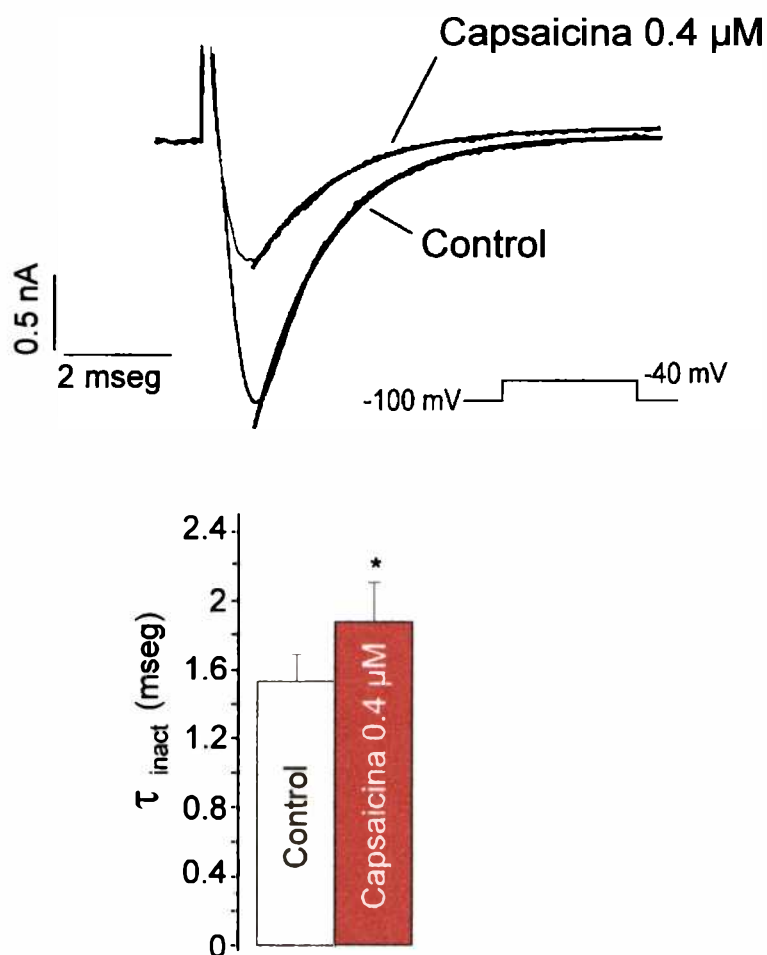


Figura 27: Efecto de capsaicina 0,4 μ M en el desarrollo de la inactivación de I_{Na} evocada por un pulso despolarizante desde -100 mV a -40 mV en células auriculares de rata. Panel superior: Registros típicos de I_{Na} con la curva de ajuste superpuesta. Panel inferior: Barras que representan el valor promedio ± 1 error estándar de la constante de tiempo de decaimiento de la inactivación (τ_{inact}) * indica $p < 0,05$ por test de t de Student para muestras apareadas.

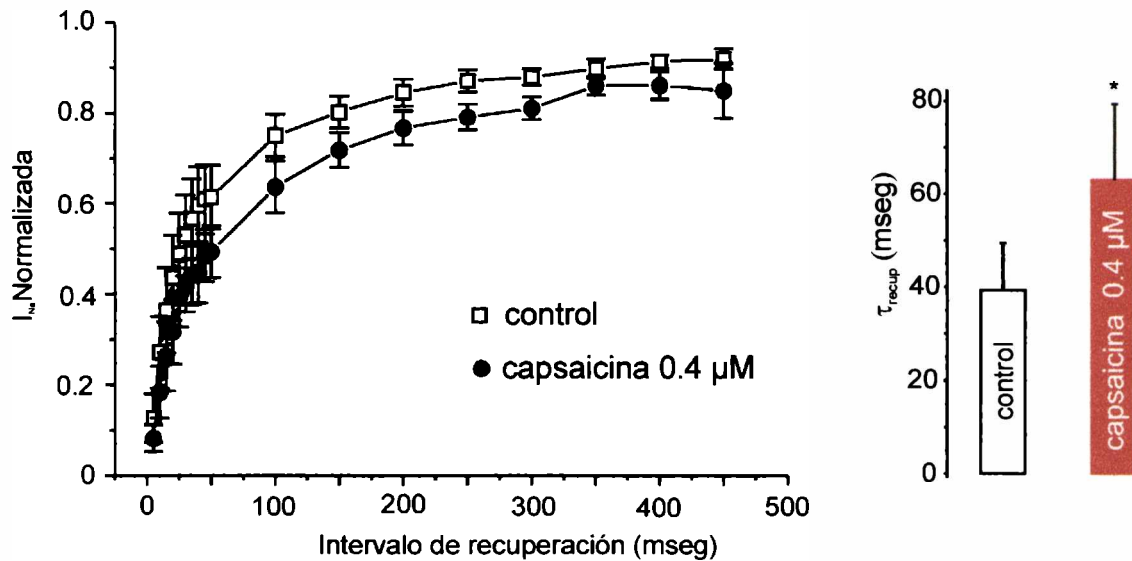


Figura 28: medida en el curso del tiempo de la recuperación de la inactivación en ausencia y presencia de capsaicina 0,4 μ M. Los puntos son valores promedios \pm error estandard de la amplitud del pico de la corriente de Na, evocada por un pulso hasta -20 mV, normalizada a la I_{Na} obtenida por cada pulso condicionante de 1 seg despolarizante hasta -20 mV y graficada en una escala lineal como función del tiempo de intervalo. Los datos fueron ajustados con una función exponencial simple tanto en condición control como después de un bloqueo estable con capsaicina 0,4 μ M.

2-2 Respuestas mecánicas a la capsaicina y la tetrodotoxina (TTX)

La Fig 29 muestra registros típicos de la fuerza desarrollada y su primera derivada en situación control y luego de exponer a la aurícula a capsaicina 1 μ M (panel izquierdo) o a tetrodotoxina 1 μ M (panel derecho).

También se investigó el efecto de capsaicina 0.4 μ M sobre el tiempo de recuperación de la inactivación utilizando un protocolo estándar de doble pulso. A efectos de alcanzar la inactivación, desde un PM de -100 mV un pulso condicionante de un seg que despolarizó hasta -20 mV fue seguido por un tiempo de recuperación variable a -100 mV y luego se aplicó un pulso de prueba de 10 mseg a -20 mV. En todos los experimentos, el par de pulsos se aplicó a 0.1 Hz, y solo fueron considerados para el análisis de datos aquellos experimentos donde el pico de amplitud de la I_{Na} evocada por el pulso condicionante fue estable. Este protocolo se realizó en la condición control y luego del efecto inhibitorio estable de la capsaicina. La amplitud del pico de la I_{Na} generada por el pulso de prueba se normalizó con el obtenido con cada pulso condicionante y se graficó en función del tiempo de recuperación en una escala lineal. Los datos obtenidos se ajustaron mediante una función exponencial simple tanto en la condición control como en presencia de capsaicina 0.4 μ M. El panel izquierdo de la Fig 28 muestra las curvas obtenidas con los valores medios correspondientes a cada tiempo de recuperación. En el panel derecho se observa que la capsaicina aumenta significativamente la constante del tiempo medio de recuperación de la inactivación (τ_{recup}) (39 ± 10 mseg versus 63 ± 16 mseg, $n=5$, $P<0.05$ test de t de Student para muestras apareadas).

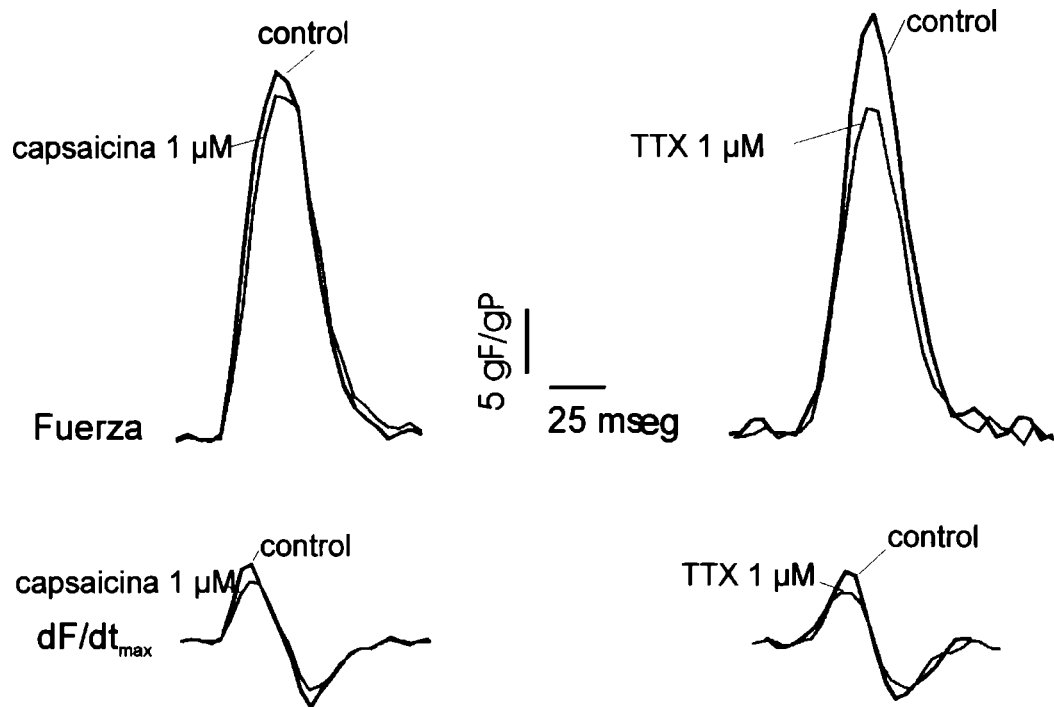


Figura 29: efecto depresor de capsaicina 1 μ M y TTX 1 μ M sobre la contractilidad auricular.

Se estudiaron las respuestas mecánicas a dosis crecientes de capsaicina (10^{-9} M a 10^{-5} M) en presencia de rojo de rutenio 5 μ M en aurícula izquierda aislada de rata, latiendo a frecuencia de contracción constante, mediante estimulación con campo eléctrico (324 lat/min). Se realizó un pretratamiento durante 20 minutos con rojo de rutenio 5 μ M y luego se adicionaron las dosis crecientes de capsaicina en presencia del colorante. El tiempo de exposición a cada dosis de capsaicina fue de 3 minutos y los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al valor control, que en este caso es el último minuto de exposición al rojo de rutenio.

La contractilidad de la aurícula aislada de rata disminuye a medida que aumenta la concentración de capsaicina ensayada, llegando a un máximo de -25 ± 4 % y de -24 ± 4 % para la fuerza desarrollada y $+dF/dt_{\max}$, respectivamente, en la dosis 10^{-5} M. La velocidad de relajación disminuye en la misma proporción, alcanzando un máximo de -25 ± 4 % en la misma dosis.

Debido a que la depresión de la contractilidad inducida por la capsaicina puede estar asociada a su efecto inhibitor sobre la I_{Na} se estudiaron las respuestas mecánicas de las aurículas izquierdas marcapaseadas a dosis crecientes de TTX, un bloqueante de los canales rápidos de sodio. Las dosis ensayadas variaron de 10^{-9} a 3×10^{-6} M con un tiempo de exposición de 3 minutos para cada dosis y los resultados están expresados como la diferencia porcentual respecto al último minuto del control. La TTX deprimió la contractilidad en forma dosis dependiente alcanzando una caída máxima en la fuerza desarrolla de -26 ± 1 % y del $+dF/dt_{\max}$ de -27 ± 1 % a la mayor dosis ensayada (3×10^{-6} M). La disminución del $-dF/dt_{\max}$ también fue semejante a la obtenida en el protocolo anterior, con una caída máxima de -27 ± 1 %.

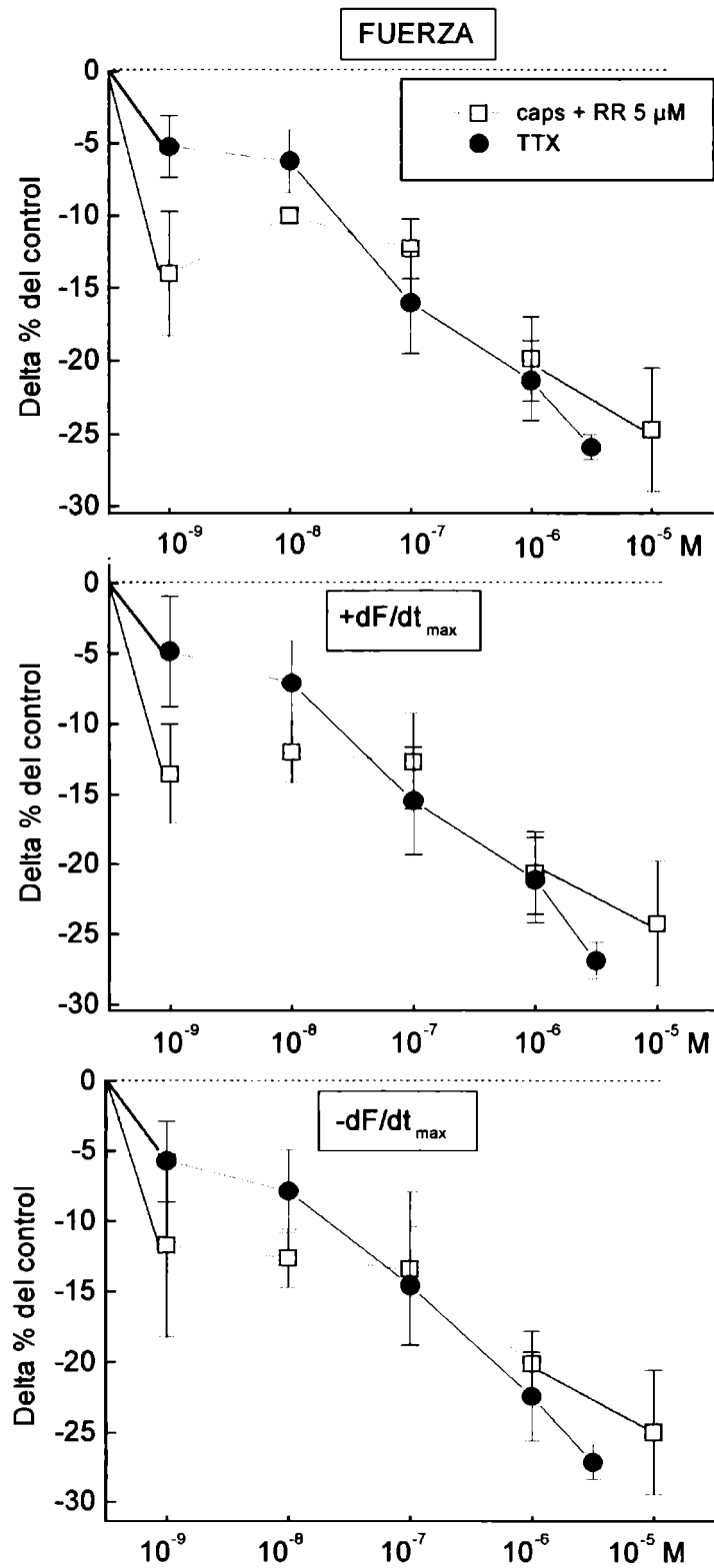


Figura 30: Curvas dosis respuesta a capsaicina en presencia de rojo de rutenio 5 μ M (n= 4) y TTX (n= 5) en aurícula izquierda aislada de rata estimulada eléctricamente a 356 lat/min.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las respuestas cronotrópicas e inotrópicas a capsaicina

El primer objetivo de este trabajo fue determinar en la aurícula aislada de rata a qué concentraciones de capsaicina se producen efectos inotrópicos positivos o negativos, y cuál es la relación de los mismos con el cambio de frecuencia de contracción espontánea; esta relación no ha sido analizada previamente y es la que evidenciará qué cambios en la actividad cardíaca produce la estimulación de las fibras sensitivas aferentes sensibles a la capsaicina en condiciones fisiológicas.

La adición acumulativa de capsaicina aumentó la frecuencia de contracción no más del 15% del valor control; este efecto cronotrópico positivo comenzó a 7×10^{-8} M, fué máximo a 2×10^{-7} M y no se detectó a partir de la misma hasta la mayor concentración ensayada (7×10^{-6} M). Las concentraciones menores (10^{-9} y 7×10^{-8} M) causaron una depresión de la fuerza desarrollada que se correlacionó significativamente con el aumento de frecuencia, es decir que puede ser interpretado como una expresión del fenómeno de la escalera negativa característica del corazón de rata. Concentraciones similares de capsaicina ensayadas en el corazón aislado de cobayo, que posee escalera positiva, producen un aumento en la contractilidad (39, 42).

Capsaicina a la concentración de 2×10^{-7} M indujo un aumento sostenido de la frecuencia de contracción mientras que la fuerza recuperó los valores controles, indicando que esta concentración de capsaicina revierte el

fenómeno de la escalera negativa, y sugiriendo que es la necesaria para que se evidencie el efecto inotrópico positivo de capsaicina en aurícula aislada de rata latiendo en forma espontánea. Esto fué demostrado ensayando una concentración de 5×10^{-7} M de capsaicina que produjo simultáneamente un 10 % de aumento de la frecuencia de contracción espontánea, un 50% de aumento del $+dF/dt_{\max}$. y un efecto lusitrópico positivo detectado por una disminución del 20% en la relación $+dF/dt_{\max}/-dF/dt_{\max}$. Estos efectos crono, ino y lusitrópico positivos están evocados por la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas sensitivas aferentes primarias presentes en la preparación auricular aislada; las evidencias para sostener este origen surgen de los resultados en los que capsaicina en presencia de rojo de rutenio, un bloqueante del canal catiónico que media la liberación de neurotransmisores en las terminaciones nerviosas aferentes primarias, no aumenta significativamente la frecuencia de contracción ni la fuerza desarrollada. Respecto a los efectos depresores de la contracción inducidos por capsaicina, es posible postular que dependen de la escalera negativa a concentraciones bajas de capsaicina y serían directos sobre los miocitos auriculares a las concentraciones más elevadas. Un efecto directo de capsaicina sobre los miocitos cardíacos ha sido postulado en preparaciones de aurícula de cobayo (41), en músculos papilares de rata (45) y en corazones perfundidos de rata (38). Recientemente, se han presentado evidencias de que el efecto inotrópico negativo de la capsaicina en el corazón perfundido de rata está relacionado con la vasoconstricción coronaria que produce la endotelina presente como neurotransmisor en las fibras sensoriales aferentes y liberada por la capsaicina (13). Como nuestras preparaciones no dependen de la perfusión coronaria es

posible sugerir que la depresión en la contractilidad sea un efecto directo de la capsaicina posiblemente relacionado con modificaciones en el potencial de acción como han propuesto previamente otros autores (41). La concentración intermedia que revierte el efecto depresor en nuestros experimentos ha sido descripta como inotrópica negativa en músculos papilares aislados de rata (45); sin embargo no lo es en la aurícula aislada de rata ya que no observamos caída en la fuerza de contracción cuando bloqueamos la liberación de neurotransmisores por la presencia de rojo de rutenio.

El aumento del inotropismo causado por la capsaicina fué también observado en las preparaciones marcapaseadas a frecuencia de contracción constante de 380 latidos por minuto, un valor que comprobamos experimentalmente era capaz de superar el efecto cronotrópico positivo de la capsaicina. El aumento en la contractilidad fue similar al observado a frecuencia de contracción espontánea para la misma concentración de capsaicina. El aumento en la velocidad de relajación no superó al de la velocidad de contracción por lo que en estas condiciones de marcapaseo no se observó efecto lusitrópico positivo. Una posible explicación para este resultado es que la elevada frecuencia de marcapaseo limite la respuesta del retículo sarcoplásmico (RS) en el proceso de relajación; se sabe que en el miocardio de rata la relajación es altamente dependiente del RS y que el aumento de frecuencia por encima de valores de 4-5 Hz no favorece una mayor actividad del SR para acelerar la relajación (103).

En estas condiciones experimentales comprobamos que el CGRP, neurotransmisor liberado desde las terminaciones sensitivas sensibles a la capsaicina es responsable del aumento de contractilidad y relajación en

aurícula aislada de rata, dado que no se detectaron estas respuestas con capsaicina en presencia de CGRP₈₋₃₇, un bloqueante de los receptores para este péptido neurotransmisor. En nuestra preparación aislada, no perfundida, la putativa liberación de endotelina debería producir efectos crono e inotrópicos positivos que se sumarían a los del CGRP y que serían bloqueados por la inhibición de la liberación de neurotransmisores en presencia de rojo de rutenio. Estos resultados descartan la participación de la endotelina, en el caso de que fuera liberada junto con CGRP en el tejido auricular de rata, como responsable, al menos parcial, de las respuestas inotrópicas positivas inducidas por la capsaicina.

La liberación de CGRP producida por capsaicina 10^{-6} M ha sido medida en el corazón aislado de cobayo (44, 98) y de rata (13). Algunas diferencias sutiles han sido descritas en la sensibilidad de los receptores de CGRP sobre la base de que algunos fragmentos de CGRP antagonizan el efecto inotrópico positivo pero no el cronotrópico positivo. Los efectos de la capsaicina son transitorios y muestran un decaimiento significativo dentro de los 10 minutos de exposición; un decaimiento similar en el aumento de la fuerza desarrollada producido por exposición a CGRP se observa en el corazón de cobayo (44) y en la aurícula de rata (37) lo cual sugiere que la variación de la contractilidad observada en el transcurso del tiempo de exposición a capsaicina sería inherente al neurotransmisor liberado. Se conoce que este neurotransmisor activa la adenilato ciclasa en músculo cardíaco (37) y en músculo liso (104). La participación del AMPc en el efecto inotrópico positivo inducido por la capsaicina fue inicialmente controvertida. Sin embargo hay evidencias que demuestran que el cronotropismo positivo se debe a cambios en la actividad de

canales de Ca^{2+} de tipo L inducidos por el AMPc (105). Por otra parte en miocitos ventriculares de rata el aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular inducido por CGRP depende de la entrada de Ca^{2+} externo a través de estos canales y no se produce en presencia de un bloqueante de proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (106). La participación del retículo sarcoplásmico en el aumento transitorio de Ca^{2+} interno que produce el CGRP fue demostrada pretratando las aurículas con cafeína; en estas condiciones, que presuponen un retículo sarcoplásmico con menor contenido de Ca^{2+} , el CGRP produce un menor incremento transitorio del Ca^{2+} intracelular (106). El CGRP también aumenta la velocidad a la cual este aumento de Ca^{2+} transitorio retorna a sus valores basales en cada contracción, efecto abolido por un bloqueante de PKA y posiblemente relacionado con la fosforilación de fosfolamban vía PKA o vía Ca-calmodulina inducida por el aumento del nivel de Ca^{2+} intracelular; la fosforilación de fosfolamban por ambas vías aumenta la velocidad de recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (107). En nuestros experimentos demostramos que la capsaicina induce un efecto lusitrópico positivo evidenciado por la disminución de la relación entre máxima velocidad de contracción/máxima velocidad de relajación. Este es un efecto característico de las intervenciones inotrópicas que aumentan el nivel de AMPc intracelular (108, 109) y estaría mediado por la activación de adenilato ciclasa a través del CGRP.

La variación del Ca^{2+} extracelular podría modificar la cantidad del neurotransmisor liberado por capsaicina (13) y/o las respuestas cronotrópica e inotrópica positivas de la aurícula a este neurotransmisor. Nuestros resultados muestran que la duplicación de la concentración de Ca^{2+} externo potenció

levemente el incremento de la contractilidad pero no la estimulación de la relajación inducidos por capsaicina por lo cual el efecto lusitrópico positivo a capsaicina dejó de ser evidente. Sin embargo, la reducción del Ca^{2+} externo, o la presencia de un bloqueante de los canales de Ca^{2+} en menor medida, disminuyó el efecto inotrópico positivo como era esperable para efectos mediados por el CGRP con participación de canales de Ca^{2+} operados por voltaje (106); los incrementos en la relajación inducidos por capsaicina no fueron disminuídos por el bajo Ca^{2+} externo dando como resultado un efecto lusitrópico positivo significativamente mayor que el evocado por capsaicina a Ca^{2+} externo normal. Estos resultados sugieren que la actividad del RS estaría menos inhibida por la baja concentración de Ca^{2+} externo que los mecanismos del desarrollo de fuerza. El aumento de la frecuencia espontánea a los dos minutos de exposición a capsaicina no fue afectado en forma significativa por la duplicación de la concentración de Ca^{2+} ni por la reducción a la mitad, sugiriendo que estas condiciones no modifican la cantidad de neurotransmisor liberado; a los 10 minutos los incrementos de la frecuencia disminuyen en los cuatro grupos pero los valores no alcanzan a ser significativamente diferentes entre ellos.

Bloquear los canales de K^+ con TEA 1 mM disminuyó el aumento de frecuencia inducido por capsaicina, sin alcanzar significación estadística. Este efecto podría justificarse, al haber un cierto grado de bloqueo de canales de K^+ que impide la manifestación dependiente de la activación de adenilato ciclasa sobre la salida de K^+ que contribuye a la actividad marcapaso (110). Los aumentos de la contractilidad y la relajación inducidos por capsaicina fueron deprimidos pero en forma no significativa por la presencia simultánea de TEA 1

mM, si bien la depresión en relajación fue más pronunciada y suprimió el efecto lusitrópico positivo. El bloqueante de los canales de K^+ dependientes de ATP, glibenclamida, abolió la respuesta mecánica a capsaicina, efecto que no sería por alteración en la liberación del neurotransmisor ya que simultáneamente capsaicina causa un efecto cronotrópico positivo de igual magnitud al evocado en ausencia de glibenclamida. Reportes previos han presentado evidencias de que la glibenclamida no modifica la liberación de CGRP inducida por la capsaicina (111). Estos resultados sugieren una interferencia del bloqueante de los canales de K_{ATP} *a posteriori* del aumento del AMPc intracelular tal como se ha demostrado en los efectos vasodilatadores del CGRP descritos en la literatura, los cuales se inhiben con glibenclamida porque mediante el bloqueo del canal se impide que el AMPc active el mismo (112). En nuestras preparaciones la difusión del oxígeno no depende de la perfusión por lo que el bloqueo de un efecto vasodilatador del CGRP no tiene consecuencias sobre el estado inotrópico. Si bien no es posible proponer un mecanismo de acción por el cual la glibenclamida produce el bloqueo de los efectos del neurotransmisor que libera la capsaicina el hallazgo es interesante ya que el mecanismo cardioprotector de los activadores de los canales de K_{ATP} (113) y cardiodepresor de los inhibidores del mismo (114) podrían estar relacionados no sólo a sus efectos sobre el tono vascular coronario sino a la potenciación e inhibición respectivamente de los efectos de CGRP y/o de otros inotrópicos positivos que utilicen el AMPc como segundo mensajero en el músculo cardíaco.

Es conocido que la liberación de CGRP también puede ser estimulada por el pH ácido y la isquemia (28, 98) y que este estímulo actúa a través del

mismo receptor sensible a capsaicina ya que la capsazepina, bloqueante específico de los mismos, y el rojo de rutenio, bloqueante de su liberación, inhiben este efecto del pH ácido (28, 30). Un objetivo de este trabajo fue determinar los efectos cronotrópicos e inotrópicos producidos por la liberación de CGRP en la aurícula aislada expuesta a acidosis metabólica. En estas preparaciones de aurículas aisladas de rata el pH ácido disminuye la frecuencia de contracción espontánea y aumenta la contractilidad por la relación negativa fuerza-frecuencia de contracción, dado que, a frecuencia constante la acidosis produce un claro efecto inotrópico negativo. Pretratando las aurículas con capsaicina el pH ácido causa una caída similar en la frecuencia espontánea pero no aumenta significativamente la contractilidad sugiriendo que la liberación de CGRP podría aumentar el efecto inotrópico negativo del pH bajo. En el mismo sentido, en las aurículas pretratadas con capsaicina y mantenidas a frecuencia de contracción constante, el pH ácido produjo un efecto inotrópico negativo mayor que en ausencia de capsaicina. Además, el bloqueo de la liberación de neurotransmisores de las fibras sensitivas aferentes primarias con rojo de rutenio aumentó el efecto inotrópico positivo del pH ácido en las aurículas latiendo a frecuencia espontánea, sin y con exposición previa a capsaicina. Estos resultados sugerían que la supresión de la liberación de CGRP deja expresar aún más el aumento en la contractilidad por la escalera negativa resultante de la caída de la frecuencia inducida por el pH ácido. En conjunto los resultados permitían sugerir que la liberación de CGRP contribuía en producir el efecto inotrópico negativo de la acidosis metabólica. Esta hipótesis fue comprobada con los experimentos en los cuales se demostró que un bloqueante de los receptores de CGRP, el CGRP₈₋₃₇, inhibe

significativamente la depresión en la contractilidad causada por el pH ácido. Un efecto similar fue obtenido por el pretratamiento con una concentración de isoproterenol que activaba la contractilidad en un nivel similar al evocado por la capsaicina.

La acidosis intracelular y el aumento de AMPc causado por el CGRP pueden afectar en forma sinérgica u opuesta a diversos mecanismos que participan en la contracción y relajación miocárdicas. El pH ácido acorta la duración del potencial de acción (116) y el CGRP lo alarga (44); el pH ácido inhibe la entrada de Ca^{2+} por canales operados por voltaje (117) y el CGRP la estimula (105); el pH ácido disminuye la captación de Ca^{2+} en vesículas de SR e inhibe su liberación (118) y el CGRP a través de activar la PKA puede aumentar la fosforilación de fosfolamban y la captación de Ca^{2+} (119); sin embargo, en el corazón perfundido de rata esta fosforilación es potenciada por la acidosis (120). El principal efecto sinérgico residiría en la disminución de la afinidad de la troponina por el Ca^{2+} producida tanto por el pH ácido (121, 122) como por la fosforilación dependiente de PKA (123) y podría ser la causa de la mayor depresión en la contractilidad causada por los dos estímulos simultáneos.

Estos resultados permiten sugerir que las fibras aferentes primarias sensibles a la capsaicina pueden participar en la contractilidad auricular a través de la liberación de CGRP y codeterminarla en situaciones de exposición de la aurícula a acidosis metabólica. El vaciamiento de estas fibras por estimulación previa podría explicar en parte el mejoramiento contráctil que se ha observado durante la reperfusión posisquémica (46) o como mecanismo de preconditionamiento (48).

Los efectos de capsaicina sobre la I_{Na} y su relación con la depresión directa de la contractilidad

Los resultados obtenidos en la respuesta mecánica de aurícula aislada a dosis aditivas de capsaicina mayores de 1 μM , que muestran una depresión en la contractilidad en forma independiente del fenómeno de la escalera negativo, permitieron sugerir que este efecto fuese debido a la acción directa de la capsaicina sobre el tejido auricular. Basados en que la capsaicina reduce la velocidad de desarrollo de la fase 0 del potencial de acción (41) investigamos los efectos de la capsaicina sobre la corriente rápida de Na^+ y su correlación con una acción inotrópica negativa directa.

El principal resultado de este estudio fue demostrar que la capsaicina tiene la capacidad de inhibir las corrientes de sodio rápidas activadas por voltaje en células aisladas de aurícula de rata. Si bien ya se había demostrado que capsaicina bloqueaba la I_{Na} en neuronas aisladas del ganglio de la raíz dorsal de cobayo y pollo (124) y en axón gigante de calamar (125), aún no había sido investigado el efecto de capsaicina sobre la I_{Na} en células cardíacas aisladas.

En nuestras condiciones experimentales, capsaicina 0.4 μM disminuyó en un 49 % la amplitud del pico de la corriente rápida de sodio sensible a TTX medida a -40 mV, y en un 72 % cuando se aumentó diez veces la concentración (4 μM). Además de la reducción de la amplitud de la I_{Na} también observamos que capsaicina 0.4 μM enlenteció la inactivación de esta corriente, y utilizando protocolos apropiados fue posible demostrar que capsaicina 0.4 μM aumentó significativamente la constante del tiempo de recuperación de la

inactivación de la I_{Na} . Ambos efectos de la capsaicina sobre la I_{Na} pueden justificar una reducción de la amplitud del potencial de acción.

Las propiedades del efecto inhibitorio de capsaicina sobre la I_{Na} en los miocitos auriculares de rata fueron similares a los descritos para la benzocaína (antiarrítmico de clase I) en miocitos ventriculares de rata (126). La capsaicina tiene una estructura molecular semejante a la de benzocaína; posee dominios hidrofílicos e hidrofóbicos separados por una amida o un ester (como otros anestésicos locales), y presenta efectos similares sobre la I_{Na} : bloquea la amplitud de la I_{Na} , aumenta el valor de la constante de tiempo para la reactivación de la I_{Na} y no exhibe un bloqueo dependiente del estímulo sobre la I_{Na} en miocitos auriculares de rata, coincidente con los resultados descritos para benzocaína en miocitos ventriculares de rata (126). En base a estas comparaciones, se podría proponer que la capsaicina, debido a sus diferentes efectos sobre la I_{Na} , podría poseer propiedades antiarrítmicas, aunque sería necesario realizar experimentos más específicos para confirmar esta hipótesis. En coincidencia con esto, ya fue descrito que la capsaicina (10-30 μM) posee propiedades antiarrítmicas y antisquémicas en corazón aislado y perfundido de rata y cobayo, aunque en el modelo experimental que utilizaron no observaron ningún cambio en el V_{max} o la amplitud del potencial de acción (50).

Nuestros experimentos mecánicos muestran que en aurícula izquierda aislada de rata, la capsaicina 1 μM , en condiciones en que no puede liberar neurotransmisores por la presencia de rojo de rutenio 5 μM , produce un efecto inotrópico negativo. Esta depresión en la contractilidad puede estar asociada a la inhibición de la I_{Na} y la demostración de que la TTX 1 μM induce un efecto inotrópico negativo en la aurícula de rata apoya esta hipótesis. La

concentración de TTX que deprimió en aproximadamente un 25% del $+dF/dt_{\max}$ fue similar a la que produce la mitad de la inhibición máxima de la I_{Na} en células musculares cardíacas (127). Otro trabajo realizado en músculo papilar aislado de cobayo también muestra que TTX produce un efecto inotrópico negativo (128). Otros autores (41) postulan un efecto estabilizante de las membranas celulares como mecanismo de acción para el efecto inotrópico negativo de la capsaicina $0,33 \mu\text{M}$ en aurícula de rata. Una explicación similar fue propuesta para el efecto inhibitorio de la capsaicina sobre la contractilidad del ventrículo izquierdo de perro (47) en cuyos miocitos no se observaron cambios ultraestructurales; este resultado permitió descartar que la disminución de la contractilidad cardíaca fuera por un efecto tóxico de la capsaicina. Sin embargo, nuestros resultados electrofisiológicos proveen una explicación alternativa de los efectos mencionados anteriormente, ya que se demostró que capsaicina $0.4 \mu\text{M}$ inhibe la I_{Na} lo que podría explicar la disminución en la velocidad de desarrollo del potencial de acción y el efecto inotrópico negativo.

CONCLUSIONES

El presente informe tiene como objetivo principal, describir el proceso de elaboración de un producto final, en el cual se aplicaron los conocimientos adquiridos durante el curso de Diseño de Producto. El proceso se desarrolló en tres etapas principales: investigación, diseño y fabricación. En la etapa de investigación, se realizó un análisis de mercado y se identificaron las necesidades de los usuarios. En la etapa de diseño, se desarrolló un prototipo y se realizaron pruebas de usabilidad. En la etapa de fabricación, se produjo el producto final y se realizó una evaluación de su calidad.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados en este trabajo tuvieron como antecedentes la descripción de efectos cronotrópico positivo e inotrópico positivo o negativo de la capsaicina en diferentes preparaciones cardíacas de diversas especies, su mediación por la liberación de neurotransmisores de fibras sensoriales aferentes primarias comprobada en algunas especies, la sensibilidad de estas fibras para liberar los mismos neurotransmisores cuando son expuestas a pH ácido y la posible modificación de corrientes iónicas que participan en la generación del potencial de acción como efecto directo de capsaicina.

De acuerdo a los objetivos planteados, el análisis de los resultados experimentales del presente trabajo ha permitido concluir que en el tejido auricular de rata la capsaicina:

- **modifica la contractilidad dependiendo de la dosis y de los cambios en frecuencia de contracción.** Por debajo de 10^{-8} M y por encima de 10^{-6} M la capsaicina deprime la actividad contráctil, dependiendo del aumento de la frecuencia de contracción a concentraciones bajas (escalera negativa) y sin relación con cambios en la frecuencia de contracción a las concentraciones altas. Efectos inotrópicos positivos y estimulantes de la relajación se evidencian a concentraciones de 10^{-7} - 10^{-8} M con o sin aumentos en la frecuencia de contracción, si bien un lusitropismo positivo con mayor estímulo de la relajación comparado con el de contracción sólo es evidente cuando la aurícula late espontáneamente, a menor frecuencia que las estimuladas eléctricamente.
- **ejerce estos efectos estimulatorios a través de liberar neurotransmisores de las fibras aferentes primarias sensitivas y**

específicamente a través de liberar CGRP. Los efectos crono e inotrópicos positivos se suprimen por el bloqueo con rojo de rutenio de los canales catiónicos responsables de la corriente que induce la liberación de los neurotransmisores en las terminaciones de las fibras sensitivas sensibles a la capsaicina. Los efectos estimulatorios sobre la contracción auricular no se producen cuando se hallan bloqueados los receptores para CGRP.

- tiene menores efectos estimulatorios de la contracción, conservando los estimulatorios sobre la relajación, cuando el calcio externo está reducido a la mitad de su concentración control o, en menor medida, cuando se bloquean los canales de Ca^{2+} operados por voltaje.

- libera neurotransmisores en presencia del bloqueo de canales de K^+ con TEA 1 mM y glibenclamida 1 μM . Ambos bloqueantes no logran modificar el efecto cronotrópico positivo inducido por capsaicina lo cual permite sugerir que la liberación de los neurotransmisores no se altera y por lo tanto no sería dependiente del bloqueo de corrientes hiperpolarizantes llevadas por estos canales. Un resultado cuyo mecanismo de producción requerirá estudios posteriores fue la ausencia de efectos inotrópicos positivos de la capsaicina estando bloqueados los canales de K_{ATP} por la presencia de glibenclamida.

- estimula la liberación de neurotransmisores, y específicamente de CGRP, que participa en la generación de efectos inotrópicos negativos por exposición a pH ácido. La importancia de la regulación de la contractilidad por las fibras aferentes sensitivas sensibles a la capsaicina durante la acidosis metabólica fue demostrada por los distintos protocolos experimentales que, en su conjunto, demuestran un componente en la

depresión de la contractilidad inducida por el pH ácido que depende de la liberación de CGRP de estas fibras.

- **posee un efecto inotrópico negativo directo, dosis dependiente, no mediado por la liberación de neurotransmisores, que se asocia con la inhibición de la corriente de Na^+ sensible a tetrodotoxina.** Bloqueada la liberación de neurotransmisores con rojo de rutenio, la capsaicina en forma dosis dependiente deprime la contractilidad auricular y la I_{Na} en células auriculares aisladas, en forma similar a lo que evoca la exposición a TTX, un bloqueante de estas corrientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Cordell GA**, Araujo OE. Capsaicin: identification, nomenclature and pharmacotherapy. *Ann Pharmacother*. 27:330-336, 1993.
2. **Maroto JV**. Horticultura herbácea especial. 4º Edición (revisada y ampliada). Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 1994.
3. **Govindarajan VS**. Capsicum production, technology, chemistry, and quality. Part 1: History, botany, cultivation, and primary processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 22:109-176, 1985.
4. **Cichewicz RH**, Thorpe PA. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J Ethnopharmacol*. 52:61-70, 1996.
5. **Norton, SA**. Useful plants of dermatology. V. *Capsicum* and capsaicin. *J Am Acad Dermatol*. 39:626-628, 1998.
6. **Thresh LT**. Isolation of capsaicin. *Pharm J*. 6:941-942, 1846.
7. **Nelson EK**. The constitution of capsaicin-the pungent principle of *capsicum*. *J Am Chem Soc*. 41:1115-1121, 1919.
8. **Nelson EK**. The constitution of capsaicin-the pungent principle of *capsicum*, II. *J Am Chem Soc*. 42:597-599, 1920.
9. **Nelson EK**, Dawson LE. The constitution of capsaicin-the pungent principle of *capsicum*, III. *J Am Chem Soc*. 45:2179-2181, 1923.
10. **Walpole CS**, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Perkins MN, Reid DJ, Winter J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A region". *J Med Chem*. 36:2362-2372, 1993.

11. **Masada Y**, Hashimoto K, Suzuki M. Analysis of the pungent principles of *capsicum annuum* by combined gas chromatography-mass espectrumetry. *J Food Sci.* 36:858-860, 1971.
12. **Holzer, P.** Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 43:144-201, 1991.
13. **Szolcsanyi J**, Oroszi G, Nemeth J, Szilvassy Z, Blasig, IE, Tosaki A. Funcional and biochemical evidence for capsaicin-induced neural endothelin release in isolated working rat heart. *Eur J Pharmacol.* 419:215-221, 2001.
14. **Besson JM**, Guilbaud G, Ollat H. Peripheral neurons in nociception: physio-pharmacological aspects. Cap. 8, pág. 109-124. John Libbey Eurotext, Paris, 1994.
15. **Buck, SH**, Burks TF. The neuropharmacology of capsaicin: Review of some recent observations. *Pharmacol Rev.* 38:179-226, 1986.
16. **Yaksh TL**, Farb DH, Leeman SE, Jessell TM. Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science.* 206:481-483, 1979.
17. **Jancsó G**, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature.* 270:741-742, 1977.
18. **Jancsó G**, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmakol.* 313:91-94, 1980.

-
19. **Gamse R**, Petsche U, Lembeck F, Jancsó G. Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somastotatin. *Brain Res.* 239:447-462, 1982.
 20. **Petshe U**, Fleischer E, Lembeck F, Handwerker HO. The effect of capsaicin application to a peripheral nerve on impulse conduction in functionally identified afferent nerve fibres. *Brain Res.* 265:233-240, 1983.
 21. **Baccaglini PI**, Hogan PG. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cell. *Proc Natl Acad Sci.* 80:594-598, 1983.
 22. **Virus RM**, Gebhart FG. Pharmacology actions of capsaicin: apparent involvement of substance P and serotonin. *Life Sci.* 25:1273-1284, 1979.
 23. **Fusco BM**, Giacobazzo M. Peppers and pain. The promise of capsaicin. *Drugs.* 53:909-914, 1997.
 24. **Caterina MJ**, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389:816-824, 1997.
 25. **Oh U**, Hwang SW, Kim D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 16:1659-1667, 1996.
 26. **Jung J**, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci.* 19:529-538, 1999.
 27. **Acs G**, Palkovits M, Blumberg PM. [³H]Resiniferatoxin binding by the human vanilloid (capsaicin) receptor. *Mol Brain Res.* 23:185-190, 1994.

-
28. **Amann R**, Maggi CA. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life Sci.* 49:849-856, 1991.
 29. **Bevan S**, Hothi S, Hughes G, James JF, Rang HP, Shah K, Walpole CSJ, Yeats JC. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol.* 107:544-552, 1992.
 30. **Franco-Cereceda A**, Kallner G, Lundberg JM. Cyclo-oxygenase products released by low pH have capsaicin-like actions on sensory nerves in the isolated guinea-pig heart. *Cardiovasc Res.* 28:365-369, 1994.
 31. **Meddings JB**, Hogaboam CM, Tran K, Reynolds JD, Wallace JL. Capsaicin effects on non-neuronal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1070:43-50, 1991.
 32. **Aranda FJ**, Villalaín J, Gómez-Fernández JC. Capsaicin affects the structure and phase organization of phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1234:225-234, 1995.
 33. **Feigin AM**, Aronov EV, Bryant BP, Teeter JH, Brand JG. Capsaicin and its analogs induce ion channels in planar lipid bilayers. *Neuroreport.* 6:2134-2136, 1995.
 34. **Urban L**, Campbell EA, Panesar M, Patel S, Chaudhry N, Kane S, Buchheit K, Sandells B, James IF. In vivo pharmacology of SDZ 249-665, a novel, non-pungent capsaicin analogue. *Pain.* 89:65-74, 2000.
 35. **Hua XY**, Chen P, Hwang J, Yaksh TL. Antinociception induced by civamide, an orally active capsaicin analogue. *Pain.* 71:313-322, 1997.
 36. **Rubino A**, Burnstock G. Capsaicin-sensitive sensory-motor neurotransmission in the peripheral control of cardiovascular function. *Cardiovasc Res.* 31:467-479, 1996.

-
37. **Sigrist S**, Franco-Cereceda A, Muff R, Henke H, Lundberg JM, Fischer JA. Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology*. 119:381-389, 1986.
 38. **Kaygisiz Z**, Cingi MI, Cingi E. Effect of capsaicin on contractility, left ventricular systolic pressure and rate of isolated perfused rat heart. *Fitoterapia*. 61:266-269, 1990.
 39. **Fukuda N**, Fujiwara M. Effect of capsaicin on the guinea-pig isolated atrium. *J Pharm Pharmacol*. 21:622-624, 1969.
 40. **Lundberg JM**, Hua Y, Fredholm B. Capsaicin-induced stimulation of the guinea-pig atrium. Involvement of a novel sensory transmitter or a direct action on myocytes? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 325:176-182, 1984.
 41. **Zernig G**, Holzer P, Lembeck F. A study of the mode and site of action of capsaicin in guinea-pig heart and rat uterus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 326:58-63, 1984.
 42. **Franco-Cereceda A**, Lundberg JM. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and capsaicin-induced stimulation of heart contractile rate and force. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 331:146-151, 1985.
 43. **Franco-Cereceda A**, Lundberg JM. Actions of calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to the contractile effects of capsaicin in the guinea-pig and rat heart in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 337:649-655, 1988.
 44. **Franco-Cereceda A**, Lundberg JM, Saria A, Schreiber W, Tritthart HA. Calcitonin gene-related peptide; release by capsaicin and prolongation of

- the action potencial in the guinea-pig heart. *Acta Physiol. Scand.* 132:181-190, 1988.
45. **Yamato T**, Aomine M, Ikeda M, Noto H, Ohta C. Inhibition of contractile tension by capsaicin in isolated rat papillary muscle. *Gen Pharmacol.* 27:129-132, 1996.
46. **Chiao H**, Caldwell RW. The role of substance P in myocardial dysfunction during ischemia and reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 353:400-407, 1996.
47. **Takaki M**, Akashi T, Ishioka K, Kikuta A, Matsubara H, Yasuhara S, Fujii W, Suga H. Effects of capsaicin on mechanoenergetics of excised cross-circulated canine left ventricle and coronary artery. *J mol cell cardiol.* 26:1227-1239, 1994.
48. **Li Y-J**, Xiao Z-S, Peng CHF, Deng H-W. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol.* 311:163-167, 1996.
49. **Ferdinandy P**, Csont T, Csonka C, Török M, Dux M, Németh J, Horváth LI, Dux L, Szilvássy Z, Jancsó G. Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 256:356-363, 1997.
50. **D'Alonzo AJ**, Grover GJ, Darbenzio RB, Hess TA, Sleph PG, Dzwonczyk S, Zhu JL, Sewter JC. In vitro effects of capsaicin: antiarrhythmic and antiischemic activity. *Eur J Pharmacol.* 272:269-278, 1995.
51. **Brain SD**, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature.* 313:54-56, 1985.

-
52. **Grace GC**, Dusting GJ, Kemp BE, Martin TJ. Endothelium and the vasodilator action of rat calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Br J Pharmacol.* 91:729-733, 1987.
 53. **Amerini S**, Mantelli L, Filippi S, Ledda F. Effects of aging and hypertension on vasorelaxant activity of calcitonin gene-related peptide: a comparison with other vasodilator agents. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:432-437, 1994.
 54. **Gulati N**, Mathison R, Huggel H, Regoli D, Beny JL. Effects of neurokinins on the isolated pig coronary artery. *Eur J Pharmacol.* 137:149-154, 1987.
 55. **Berkemboom G**, Depierreux M, Fontaine J. The influence of atherosclerosis on the mechanical responses of human isolated coronary arteries to substance P, isoprenaline and noradrenaline. *Br J Pharmacol.* 92:113-120, 1987.
 56. **Hoover DB**, Hossler FE. Vasoconstrictor and dilator responses to neurokinin A in isolated guinea pig heart. *Peptides.* 14:29-36, 1993.
 57. **McEwan J**, Larkin S, Davies G, Chierchia S, Brown M, Stevenson J, MacIntyre I, Maseri A. Calcitonin gene-related peptide: a potent dilator of human epicardial coronary arteries. *Circulation.* 74:1243-1247, 1986.
 58. **Franco-Cereceda A**. Calcitonin gene-related peptide and human epicardial coronary arteries: presence, release and vasodilator effects. *Br J Pharmacol.* 102:506-510, 1991.
 59. **Kawasaki H**, Saito A, Takasaki K. Age-related decrease of calcitonin gene-related peptide-containing innervation in the mesenteric resistance vessel of the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 67:733-743, 1990.

-
60. **Belai A**, Burnstock G. Changes in adrenergic and peptidergic nerves in the submucous plexus of streptozotocin-diabetic rat ileum. *Gastroenterology*. 98:1427-1436, 1990.
61. **Julu POO**. The correlation between sensory nerve conduction velocities and three metabolic indices in rats treated with streptozotocin. *Diabetologia*. 31:247-253, 1988.
62. **Ralevic V**, Belai A, Burnstock G. Impaired sensory-motor nerve function in the isolated mesenteric arterial bed of streptozotocin-diabetic and ganglioside-treated streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 110:1105-1111, 1993.
63. **Otsuka M**, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Am Physiol Soc*. 73:229-308, 1993.
64. **Saito A**, Ishikawa T, Kimura S, Goto K. Role of calcitonin gene-related peptide as cardiogenic neurotransmitter in guinea-pig left atria. *J Pharmacol Exp Ther*. 243:731-736, 1987.
65. **Wimalawansa SJ**. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology and therapeutic potentials. *Endocrine Rev*. 17:533-585, 1996.
66. **Mantelli L**, Amerini S, Filippi S, Ledda F. Blockade of adenosine receptors unmasks a stimulatory effect of ATP on cardiac contractility. *Br J Pharmacol*. 109:1268-1271, 1993.
67. **Rubino A**, Amerini S, Ledda F, Mantelli L. ATP modulates the efferent function of capsaicin-sensitive neurones in isolated guinea-pig atria. *Br J Pharmacol*. 105:516-520, 1992.

-
68. **White CB**, Roberts AM, Joshua IG. Arteriolar dilation mediated by capsaicin and calcitonin gene-related peptide in rats. *Am J Physiol.* 265:H1411-H1415, 1993.
69. **Kawasaki H**, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature.* 335:164-167, 1988.
70. **Han S**, Naes L, Westfall TC. Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilatation of the mesenteric arterial bed by CGRP(8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 168:786-791, 1990.
71. **Fujimori A**, Saito A, Kimura S, Goto K. Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from capsaicin-sensitive vasodilator nerves in the rat mesenteric artery. *Neurosci Lett.* 112:173-178, 1990.
72. **Manzini S**, Perretti F, Tramontana M, Del Bianco E, Santicioli P, Maggi CA, Geppetti P. Neurochemical evidence of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity (CGRP-LI) release from capsaicin-sensitive nerves in rat mesenteric arteries and veins. *Gen Pharmacol.* 22:275-278, 1991.
73. **Butler A**, Worton SP, O'Shaughnessy CT, Connor HE. Sensory-nerve mediated relaxation of guinea-pig isolated pulmonary artery: prejunctional modulation by α_2 -adrenoceptor agonist but not sumatriptan. *Br J Pharmacol.* 109:126-130, 1993.
74. **McCulloch J**, Uddman R, Kingman TA, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:5731-5735, 1986.

-
75. **Jansen I**, Alafaci C, Uddman R, Edvinson L. Evidence that calcitonin gene-related peptide contributes to the capsaicin-induced relaxation of guinea-pig cerebral arteries. *Regul Pept.* 31:167-178, 1986.
76. **Edwards RA**, Stack EJ, Trizna W. Calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and relaxes intracerebral arterioles. *J Pharmacol Exp Ther.* 257:1020-1024, 1991.
77. **Maynard KI**, Saville VL, Burnstock G. Sensory-motor neuromodulation of sympathetic vasoconstriction in the rat rabbit central ear artery. *Eur J Pharmacol.* 187:171-182, 1990.
78. **Kim C**, Roberts AM, Joshua IG. Differences in the capsaicin-induced dilation of arterioles and venules in rat striated muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 273:605-610, 1995.
79. **Corr L**, Burnstock G. Vasodilator response of coronary smooth muscle to the sympathetic co-transmitters noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol.* 104:337-342, 1991.
80. **Vials AJ**, Burnstock G. Differential effects of ATP- and 2-methyl-thioATP-induced relaxation in guinea-pig coronary vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:757-764, 1994.
81. **Rubino A**. Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) neural control of the atrial myocardium. *Gen Pharmacol.* 24:539-545, 1993.
82. **Nuki C**, Kawasaki H, Takasaki K, Wada A. Pharmacological characterization of presynaptic calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors on CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric resistance vessels. *J Pharmacol Exp Ther.* 268:59-64, 1994.

-
83. **Rubino A**, **Ralevic V**, **Burnstock G**. The P_1 -purinoceptors that mediate the prejunctional inhibitory effects of adenosine on capsaicin-sensitive nonadrenergic noncholinergic neurotransmission in the rat mesenteric arterial bed are of the A_1 subtype. *J Pharmacol Exp Ther*. 267:1100-1104, 1993.
84. **Li Y**, **Yu X**, **Deng H**. Nitric oxide modulates responses to sensory nerve activation of the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol*. 239:127-132, 1993.
85. **Rubino A**, **Mantelli L**, **Amerini S**, **Ledda F**. Adenosine modulation of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in isolated guinea-pig atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 342:520-522, 1990.
86. **Mantelli L**, **Amerini S**, **Rubino A**, **Ledda F**. Characterization of opioid receptors modulating the function of capsaicin-sensitive neurons in guinea-pig atria. *Eur J Pharmacol*. 180:325-330, 1990.
87. **Li Y**, **Duckles SP**. Differential effects of neuropeptide Y and opioids on neurogenic responses of the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol*. 195:365-372, 1991.
88. **Ralevic V**, **Rubino A**, **Burnstock G**. Prejunctional modulation of sensory-motor nerve mediated vasodilatation of the rat mesenteric arterial bed by opioid peptides. *J Pharmacol Exp Ther*. 268:772-778, 1994.
89. **Rubino A**, **Ralevic V**, **Burnstock G**. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-evoked inotropism during hyper- and hypo-sensory-motor innervation in rat atria. *J Auton Pharmacol*. 17:121-127, 1997.

90. **Amerini S**, Rubino A, Filippi S, Ledda F. Modulation by adrenergic transmitters of the efferent function of capsaicin-sensitive nerves in cardiac tissue. *Neuropeptides*. 20:225-232, 1991.
91. **Kawasaki H**, Nuki C, Saito A, Takasaki K. Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther*. 252:403-409, 1990.
92. **Rubino A**, Ralevic V, Burnstock G. Sympathetic neurotransmission in isolated rat atria after sensory-motor denervation by neonatal treatment with capsaicin. *J Pharmacol Exp Ther*. 282:671-675, 1997.
93. **Armour JA**, Yuan B, Butler CK. Cardiac responses elicited by peptides administered to canine intrinsic cardiac neurons. *Peptides*. 11:753-761, 1990.
94. **Armour JA**, Huang MH, Smith FM. Peptidergic modulation of in situ canine intrinsic cardiac neurons. *Peptides*. 14:191-202, 1993.
95. **Chiao H**, Caldwell RW. Local cardiac effects of substance P: roles of acetylcholine and noradrenaline. *Br J Pharmacol*. 114:283-288, 1995.
96. **Hassall CJS**, James S, Burnstock G. A subpopulation of intracardiac neurons from the guinea-pig heart expresses substance P binding sites. *Cardioscience*. 6:157-163, 1995.
97. **Roberts RGD**, Stevenson JE, Westerman RA, Pennefather J. Nicotinic acetylcholine receptors on capsaicin-sensitive nerves. *NeuroReport*. 6:1578-1582, 1995.
98. **Franco-Cereceda A**, Lunberg JM. Differential release of calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y from the isolated heart by capsaicin,

DONACION.....

A.....

Fecha 25-04-03

Ine. B..... Inv..... B. 57003

- ischaemia, nicotine, bradykinin and ouabain. *Acta Physiol Scand.* 135:173-187, 1989.
99. **Li Z**, Duckles SP. Acute effects of nicotine on rat mesenteric vasculature and tail artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 264:1305-1310, 1993.
100. **Inscho EW**, Wilfinger WW, Banks RO. Dissociation and enrichment of rat atrial myocytes containing atrial natriuretic factor (ANF). *Hormone Res.* 24:26-37, 1986.
101. **Hamill OP**, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high-resolution current readings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100, 1981.
102. **Grassi AO**, Cirigliano RA, Cingolani HE. Myocardial potassium balance and metabolic acid-base alterations in the perfused rat heart. *Arch Int Physiol Biochem.* 81: 427-437, 1973.
103. **Layland J**, Kentish JC. Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol.* 276:H9-H18, 1999.
104. **Ficus RR**, Zhou HL, Wang K, Han C, Ali S, Joyce CD, Murad F. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-induced cyclic AMP, cyclic GMP and vasorelaxant responses in rat thoracic aorta are antagonized by blockers of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). *Neuropeptides.* 20:133-143, 1991.
105. **Ono K**, Delay M, Nakoyima T, Irisawa H, Giles W. Calcitonin gene-related peptide regulates calcium current in heart muscle. *Nature.* 340:721-724, 1989.

-
106. **Huang MH**, Knight PR, Izzo JL. Jr. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release involved in positive inotropic effect mediated by CGRP in ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 276:R259-R264, 1999.
107. **Kranias EG**. Regulation of Ca^{2+} transport by 3',5'-AMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 844:193-199, 1985.
108. **Grassi AO**, Pérez Alzueta AD, Cingolani HE. Effect of isoproterenol on relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation. *Am J Physiol.* 233:H404-H409, 1977.
109. **Vittone L**, Grassi AO, Chiappe L, Argel M, Cingolani HE. Relaxing effects of pharmacological interventions increasing cAMP in rat heart. *Am J Physiol.* 240:H441-H447, 1981.
110. **Connors SP**, Terrar DA. The effects of forskolin in activation and deactivation of time-dependent potassium current in ventricular cells isolated from guinea-pig heart. *J Physiol (London).* 429:109, 1990.
111. **Kallner G**, Franco-Cereceda A. Ion channels involved in the release of calcitonin gene-related peptide by low pH, prostacyclin and capsaicin in the isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol.* 352:223-228, 1998.
112. **Saito K**, Sakai K. Possible involvement of K(ATP) channel activation in depressor responses to vasoactive neuropeptides in rats. *Jpn J Pharmacol.* 76:227-231, 1998.
113. **Lederer WJ**, Nichols CG, Smith GL. The mechanism of early contractile failure of isolated rat ventricular myocytes subjected to complete metabolic blockade. *J Physiol.* 413:329-349, 1989.

-
114. **Randall MD.** The involvement of ATP-sensitive potassium channels and adenosine in the regulation of coronary flow in the isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol.* 116:3068-3074, 1995.
 115. **Franco-Cereceda A,** Kallner G, Lundberg JM. Capsazepine-sensitive release of calcitonin gene-related peptide from C-fibre afferents in guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol.* 238: 311-316, 1993.
 116. **Chesnais JM,** Coraboeuff E, Sauviat MP, Vassas JM. Sensitivity to H, Li and Mg ions of the slow inward sodium current in frog atrial fibres. *Mol Cell Cardiol.* 7:627-642, 1975.
 117. **Irisawa H,** Sato R. Intra- and extracellular actions of protons on the calcium current of isolated guinea-pig ventricular cells. *Circ Res.* 59:348-355, 1986.
 118. **Grassi de Gende, A.** The effect of pH on the calcium dependence of calcium accumulation in dog cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol.* 20:1087-1093, 1988.
 119. **Tada M,** Yamada M, Kadoma M, Inui M, Ohomori F. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem.* 46:33-95, 1982.
 120. **Vittone L,** Mundiña-Weilenmann C, Said M, Mattiazzi A. Mechanisms involved in the acidosis enhancement of the isoproterenol-induced phosphorylation of phospholamban in the intact heart. *J Biol Chem.* 273:9804-9811, 1998.
 121. **Mattiazzi AR,** Cingolani HE, Spacapan de Castuma E. Relationship between calcium and hydrogen ions in heart muscle. *Am J Physiol.* 237:H497-H503, 1979.

-
122. **Blanchard EM**, Solaro RJ. Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acid pH. *Circ Res.* 55:382-391, 1984.
123. **Zhang R**, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res.* 76:1028-1035, 1995.
124. **Petersen M**, Pierau FK, Weyrich M. The influence of capsaicin on membrane currents in dorsal root ganglion neurones of guinea-pig and chicken. *Pflügers Arch.* 409:403-410, 1987.
125. **Yanamaka K**, Kigoshi S, Muramatsu I. Conduction-block induced by capsaicin in crayfish giant axon. *Brain Res.* 300:113-119, 1984.
126. **Sanchez-Chapula J**, Tsuda Y, Josephson IR. Voltage- and use-dependent effects of lidocaine on sodium current in rat single ventricular cells. *Circ Res.* 52:557-565, 1983.
127. **Brown AM**, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol (Lond).* 318:479-500, 1981.
128. **Hornerjager P**. The contribution of Na channel block to the negative inotropic effect of antiarrhythmic drugs. *Basic Res Cardiol.* 81:33-37, 1986.